Fakultät für Physik und Astronomie

Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Diplomarbeit

im Studiengang Physik

vorgelegt von

Tobias Aurelius Knoch

aus Mannheim

4. Februar 1998

Dreidimensionale Organisation von Chromosomen- Domänen in Simulation und Experiment

Die Diplomarbeit wurde von Tobias A. Knoch ausgeführt

am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg
in der Heidelberg 3D Human Genome Study Group
als Teil des Deutschen Human Genom Projekts

unter der Betreuung von
Herrn Prof. Dr. Jörg Langowski

sowie von
Herrn Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer
Institut für Angewandte Physik

Zusammenfassung

Um Aussagen über die dreidimensionale Organisation von Chromosomen in der Interphase zu machen, wurden Monte-Carlo- und Brownsche-Dynamik-Simulationen von Chromosomenterritorien mit Hilfe eines Polymeransatzes durchgeführt. Daraus wurden Observable (verschiedene Abstandsverteilungen zwischen genomischen Markern, Aufenthaltswahrscheinlichkeit und Dichte) berechnet, die für die Vorhersage und Interpretation von Experimenten dienen. Damit können Modelle der chromosomalen Organisation, insbesondere das Random-Walk-Giant-Loop- (MLS) und das Multi-Loop-Subcompartment-Modell, unterschieden werden.

Für die Bestimmung von Abstandsverteilungen zwischen genomischen Markern der Prader-Labhart-Willi/Angelmann (PLWS/A) Region wurden Experimente mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) durchgeführt. Zellkerne von Fibroblasten wurden mit schonender Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) präpariert. Über die Signal-Brightness, das Signalvolumen, die Intergrierte Fluoreszenz Intensität (IFI) und den Abstand homologer Chromosomen wurden ebenfalls Aussagen gemacht.

Vergleiche zwischen Simulation und Experiment ergaben starke Hinweise für das MLS-Modell, sowie eine unterschiedliche Organisation zwischen mütterlichem und väterlichem Chromosom 15.

Im Hinblick auf zukünftige komplexere Fragestellungen der Gesamtorganisation des Zellkerns stellte sich die Theorie der Fraktale für neue Analysemethoden als geeignet heraus. Die Ergebnisse der Simulationen zeigte dabei multifraktales Verhalten. Erstmals könnte damit die Fraktalität und Multifraktalität einer zellulären Organisationsstruktur gezeigt worden sein. Damit besteht nun die Möglichkeit aus der fraktalen Struktur Aussagen über Diffusioneigenschaften und andere Organisationsmerkmale im Zellkern zu treffen.

Three - Dimensional Organization of Chromosome Territories in Simulation and Experiment

Abstract

To draw conclusions about the three-dimensional organization of interphase-chromosomes, Monte-Carlo and Brownian-Dynamic simulations of chromosomal territorries were conducted, using a polymer model for the chromatin fiber. From the simulated configuration ensembles observables (various distance distributions between genomic markers, radial space distribution and density) were calculated and used for predictions and interpretation of experiments.It was possible to distinguish between different models of chromosomal organization, especially between the Random-Walk-Giant-Loop- (RWGL) and the Multi-Loop-Subcompartment-model.

For the determination of distance distributions between genomic markers of the Prader-Labhart-Willi/Angelmann region (PLWS/A) experiments were made with a confocal Laser-Scanning-Microscope (CLSM). Cell nuclei of fibroblast cells were prepared with soft Fluorescent-in-situ-Hybridization (FISH). Conclusions can be drawn from the signal-brightness, signal-volume, Integrated Fluorescent Intensity (IFI) and the distance between homologous chromosomes.

Comparisons between simulation and experiment lead to strong hints for the MLS-model, as well as ab different organization of maternal and paternal chromsome15.

With respect to future aspects of more complexe questions on the total organization of cellnuclei the theory of fractals proved very worthwhile for new methods of analysis. The results of the simulations thereby showed multi-fractal behaviour. Thus for the first time the fractal and multi-fractal behaviour of a cellular-organization-structure was determined. Consequently possibilities exist to draw conclusions from the fractal structure for diffussion behaviour and other organizational patterns of the cell nucleus.

Mein Dank gilt

Prof. Dr. Jörg Langowski für die intensive Betreuung dieser Arbeit, seine offene Kritik, seine vielseitige Unterstützung, die Schaffung der ungewöhnlich interdisziplinären Athomosphäre, wie sie selten in einer Arbeitsgruppe anzutreffen ist, sowie die Freiräume, die er mir zum eigenständigen Entwickeln zahlreicher Ideen gewährte.

Dr. Katalin Tóth für viele gute Tips und kritische Fragen zu den Details dieser Arbeit, sowie die gute Laune, die sie trotz tropischen Temperaturen und betäubendem Lärm immer verbreitete.

Dr. Christian Münkel für die Entwicklung der parallelen Simulationssoftware, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, seine ausgezeichnete Anleitung, Detailbetreuung und Unterstützung bei allen Software und Computerproblemen.

Diplom Physiker Markus Hammermann für die Aufmunterungen, Diskussionen, die unermüdliche Durchsicht dieser Arbeit und das gute Zusammenarbeiten im gleichen Labor, sowie für seinen exzellenten klassischen Musikgeschmack, der das Arbeiten oft erleichterte.

Thomas Weidemann für die unermüdliche Korrektur dieser Arbeit, das Diskutieren zahlreicher wissenschaftlicher Probleme und die Entwicklung zukunftsträchtiger Ideen.

Dr. Waldemar Waldeck und seinen Mitarbeitern, für die zahlreichen Diskussionen über biologische Fragestellungen und deren Klärung, die generell gute und fröhliche Zusammenarbeit, sowie insbesonder *Gabi Müller* und Sylvia Ochsas für die Einführung in einige biologischen Experimentiertechniken.

Dr. Karsten Rippe für seine stets kritischen Anmerkungen und die Unterstützung bei zahlreichen Problemen mit dem Macintosh.

der gesamten Gruppe Biophysik der Makromoleküle für die nette Atmosphäre und Hilfsbereitschaft.

Tobias Reber, Operator der SP2 in der Zentralen Datenverarbeitung des DKFZ, für die Hilfe bei zahlreichen Problemen mit der SP2, sowie deren Wartung auch noch an späten Freitag Nachmittagen.

dem Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg und seinen Mitarbeitern für die exzellente Infrastruktur und den zahlreichen Möglichkeiten, wie sie nur in einem internationales Großforschungszentrum gegeben sind.

Dr. Ing. Gerhard Huber, Institut für Boden und Felsmechanik, Universität Karlsruhe, für die Unterstützung mit Rechenzeit auf der SP2 im Rechenzentrum Karlsruhe und den damit verbundenen Problemen.

Dr. Karin Büttig, im Labor von Prof. Dr. Horsthemke, für die Bereitstellung der genauen Details über die in dieser Arbeit verwendeten Klone und für deren Charakterisierung in ihrer Arbeit.

Prof. Dr. Bernhard Horsthemke und seinem Labor für die mehrmalige Herstellung großer Mengen der Klone, sowie für die großzügige Bereitstellung verschiedener Zellinien.

Dr. Irina Solovei, im Labor von Prof. Dr. T. Cremer für das Markieren der Klone, das Entwickeln der 3D-FISH-Technik und der steten Bereitschaft ihr Wissen weiterzugeben, sowie für zahlreiche Diskussionen und die Unterstützung, die sie mir bei allen experimentellen Fragen zukommen ließ.

Prof. Dr. Dr. Thomas Cremer und seiner Frau für die Unterstützung in ihrem Labor, zahlreiche weiterbringende Diskussionen und die Gastfreundschaft in ihrem Haus während des Aufenthalts in München.
Diplom Physiker Joachim Rauch für die gute Zusammenarbeit im gesamten experimentellen Teil dieser Arbeit, seine ausgezeichnete Unterstützung und Fortentwicklung des Prader Willi Projektes, sowie für seine Geduld.
Diplom Physiker Harald Bornfleth für die Entwicklung der in dieser Arbeit verwendeten Bildverarbeitungssoftware, das Einführen in diese, sowie die stete Unterstützung bei vielen Fragen zu Mikroskop und Mikroskopaufnahmen.
der gesamten Gruppe Angewandte Optik und Informationsverarbeitung für die Eichung des Mikroskops, die gute Zusammenarbeit und die kritischen Diskussionen, die mich anspornten das für unmöglich Gehaltene in die Realität umzusetzen.
Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer für die Möglichkeiten, die er mir in seiner Arbeitsgruppe bot, zahlreiche Gespräche, die Vertretung dieser Arbeit gegenüber der Fakultät für Physik der Universität Heidelberg, sowie für seine langjährige Untestützung.
den gesamten Mitgliedern der Heidelberg 3D Human Genome Study Group für die Möglichkeiten die sie schaffen und die Diskussionen.
Dr. Eric Drexler und dem Foresight Institute, Palo Alto, Californien, USA für die Möglichkeit die in dieser Arbeit gewonnen Ergebnisse auf der 5th International Foresight Conference on Molecular Nanotechnology, Palo Alto, einem internationale Publikum vorzustellen, sowie den zahlreichen Diskussionen und Ideen seit 1986.
der Studienstiftung des Deutschen Volkes für die freundliche Unterstützung während meiner Studienzeit.
Linus C. Pauling für seine Offenheit und als Vorbild für ein wissenschaftliches Leben, sowie seine Bereitschaft stets mit hohem moralischen Anspruch den Menschen denen die Wissenschaft nützen soll, unvoreingenommen und trotz vieler Hindernisse zu dienen.

allen denjenigen die hier nicht genannt sind und an dieser Arbeit und an meinem bisherigen Leben beteiligt waren, mich beeinflußt und bewegt haben.

Meinen Eltern für ihre liebevolle Unterstützung, die Möglichkeiten die sie mir boten Einsichten in fremde Welten, Länder und Kulturen zu gewinnen, sowie ihren uneingeschränkten Rückhalt auch in schwierigen Zeiten.
Ihnen gebührt mein größter Dank !

Heidelberg, 4. Februar 1998

Tobias Aurelius Knoch

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis i
Verzeichnis der Abbildungen iii
Einleitung 1

I. Biologische Grundlagen 4
I.1 DNA 4
I.2 Nukleosomen 6
I.3 Chromatin 7
I.4 Chromosomen 8

II. Chromosomenanordnung im Interphasezellkern 10
II.1 Modell von Rabl (1885) und Boveri (1909) 11
II.2 Modell von Comings (1968) 11
II.3 Modell von Pienta und Coffey (1984) 12
II.4 Inter-Chromosome-Domain (ICD) Modell (1990-1996) 13
II.5 Random-Walk-Giant-Loop (RWGL) Modell (1992-1997) 14
II.5.1 Random-Walk-Modell von 0,1Mbp bis 1,5 Mbp 15
II.5.2 RWGL-Modell von 2Mbp bis 200Mbp 18
II.5.3 Uneindeutigkeit des RWGL-Modells 19
II.6 Multi-Loop-Subcompartment (MLS) Modell 19

III. Simulationen 21
III.1 Simulationsmethoden 21
III.1.1 Chromatin als Polymer - Allgemeines 21
III.1.2 Chromatin als Polymer - Modellierte Eigenschaften 22
III.1.3 Brownsche-Dynamik-Algorithmen 24
III.1.4 Monte-Carlo-Algorithmen 25
III.2 Fraktale Analyseverfahren komplexer Systeme 27
III.2.1 Einführung 27
III.2.2 Stechzirkel- und Box-Verfahren 28
III.3 Observable der Simulationsanalyse 29
III.3.1 Energien, Geometriedaten und Segmentlänge 29
III.3.2 radiale Aufenthaltswahrscheinlichkeit und Dichte 30
III.3.3 Räumliche Abstände 30
III.3.4 Räumliche Abstände zwischen genomischen Markern 30
III.3.5 Aufenthaltswahrscheinlichkeit von genomischen Markern 31
III.3.6 Fraktale Dimension 32
III.4 Simulationsdurchführung 32
III.4.1 Ideogramme 33
III.4.2 Erzeugen der Ausgangskonfiguration 33

III.4.2 Erzeugen der Ausgangskonfiguration . . . 33
III.4.3 Simulationsansatz des MLS-Modells . . . 36
III.4.4 Simulationsansatz des RWGL-Modells . . . 37
III.4.5 Simulationsansatz anderer Modelle . . . 39
III.4.6 Simulationsdurchführung . . . 40
III.5 Ergebnisse der Simulationsanalyse . . . 41
III.5.1 Analyse des MLS-Modells . . . 43
III.5.2 Analyse des RWGL-Modells . . . 48
III.5.3 Multifraktalität von Chromosomen . . . 52
III.5.4 Vergleich der Modelle . . . 55

IV. Experimente . . . 57
IV.1 Experimentelle Methoden . . . 57
IV.1.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung . . . 57
IV.1.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) . . . 61
IV.1.3 Das Konfokale Mikroskop Leica TCS NT . . . 62
IV.1.4 Bildverarbeitung . . . 64
IV.2 Observablen der Experimentanalyse . . . 65
IV.2.1 Schwellwert . . . 65
IV.2.2 Brightness . . . 65
IV.2.3 Signalvolumen . . . 66
IV.2.4 Integrierte Fluoreszenz Intensität (IFI) . . . 66
IV.2.5 Distanzen zwischen genetischen Markern . . . 66
IV.2.6 Distanzen zwischen homologen Chromosomen . . . 66
IV.3 Experimentdurchführung . . . 67
IV.3.1 Experimentansatz und Objektträgerpräparation . . . 68
IV.3.2 Durchführung der Mikroskopaufnahmen . . . 69
IV.4 Ergebnisse Experimentanalyse . . . 72
IV.4.1 Durchführung der Experimentanalyse . . . 73
IV.4.2 Analyse der Objektträger . . . 73
IV.4.2 Schwellwert . . . 74
IV.4.2 Brightness . . . 75
IV.4.3 Volumen . . . 75
IV.4.4 Integrierte Fluoreszenz Intensität (IFI) . . . 76
IV.4.5 Distanzen zwischen genetischen Markern . . . 76
IV.4.6 Distanzen zwischen homologen Chromosomen . . . 78

V. Vergleich zwischen Simulation und Experiment . . . 79

VI. Zusammenfassung und Ausblick . . . 82

Anhang . . . 87
Literaturverzeichnis . . . 89
Erklärung . . . 95

Abbildungen und Tabellen

Abb.I.1: DNA - Doppelhelix 5

Abb.I.2: Darstellung der Nukleosomenstruktur 7

Abb.I.3: Chromati: „Beads on a string“ und 30nm Faser 7

Abb.I.4: Metapaseplatte und Metaphasechromosom 9

Abb.II.1: Modell von Rabl und Boveri 11

Abb.II.2: Modell von Pienta und Coffey 14

Abb.II.3: ICD-Modell 14

Abb.II.4: Abstandsverteilungen von Yokota (1995) 15

Abb.II.5: Mathematisches Modell des RWGL-Modells 16

Abb.II.6: RWGL- und MLS-Modell im Vergleich 20

Abb.III.1: Segmentanordnung im Polymermodel 22

Abb.III.2: Fraktale Dimensionen verschiedener Kurven 27

Abb.III.3 : Stechzirkelverfahren 28

Abb.III.4: Exaktes Stechzirkelverfahren 31

Abb.III.5: Ideogramm Darstellung 35

Abb.III.6: Attribute eines Segmentes 36

Abb.III.7: Anfangskonfiguration eines MLS-Modells 37

Abb.III.8: Anfangskonfigurationen des RWGL-Modells 39

Abb.III.9: Gyrationsradius und Eigenwerte des Trägheitstensors 40

Abb.III.10: Verschiedene Modelle nach 200.000 Monte-Carlo-Schritten 42

Abb.III.11: FromBegin Abstände im MLS-Feld 1 43

Abb.III.12: RandomPairs Abstände im MLS-Feld 1 44

Abb.III.13: Radiale Aufenthaltswahrscheinlichkeit und Dichte im MLS-Feld 1 45

Abb.III.14: Segmentlängenverteilungen im MLS-Feld 1 46

Abb.III.15: Ergebnisse der Observablen im MLS-Feld 2 47

Abb.III.16: FromBegin Abstände im RWGL-Modell 49

Abb.III.17: RandomPairs Abstände im RWGL-Modell 50

Abb.III.18: Radiale Aufenthaltswahrscheinlichkeit und Dichte im RWGL-Modell 51

Abb.III.19: Segmentlängenverteilungen im RWGL-Modell 52

Abb.III.20: Fraktale Dimensionen im MLS-Feld 1 53
Abb.III.21: Fraktale Dimensionen im MLS-Feld 1 54
Abb.III.22: Fraktale Dimensionen im RWGL-Modell 54
Abb.III.23: Vergleich verschiedener Modelle 56
Abb.IV.1: Schema der Hybridisierung 58
Abb.IV.2: Fixierung der Zellen: 2D- und 3D Präparation 59
Abb.IV.3: Hybridisirungsprotokoll 60
Abb.IV.4: Prinzip des konvokalen Laser-Scanning Microscops 62
Abb.IV.5: Aufbau des Leica TCS NT 63
Abb.IV.6: Scannerkopf von Leica TCS NT 63
Abb.IV.7: Verwndete Klone 69
Abb.IV.8: Distanzverteilung und Signifikantztest 77
Abb.IV.9: Vergleich der Simulationen mit gemessenen Abstandsverteilungen 80
Abb.IV.10: Vergleich der Simulationen mit gemessenen Abstandsverteilungen 81

Tabellen

Tab..III.1: Chromosomen- und Chromosomenarmlänge 35
Tab..III.2: Bestimmung der Linkerlängen im RWGL-Modell 38
Tab..IV.1: Fluoreszenzfarbstoffe und ihre spektralen Eigenschaften 61
Tab..IV.3: Experimentansatz und hergestellte Objektträger 70
Tab..IV.3: Ergebnisse der Durchführung 72
Tab..IV.4: Schwellwert und Integrierte Fluoreszenzintensität 74
Tab..IV.5: Brightness und Volumen 74
Tab..IV.6: Brightness der Einezelsignale 74
Tab..IV.7: Volumen der Einzelsignale 75
Tab..IV.8: Integrierte Fluoreszenz Intesität 76
Tab..IV.9: Ergebnisse der Diastanzverteilungen 6
Tab..A.1: Simulationsansatz MLS-Feld 1 76
Tab..A.2: Simulationsansatz MLS-Feld 2 76
Tab..A.3: Simulationsansatz RWGL-Modell 6
Tab..A.4: Simulationsansatz anderer Modelle 76

EINLEITUNG

Seit mehr als dreihundert Jahren steht die Zelle im Blickpunkt der Forschung. 1839 konnte Schwann mit Hilfe verbesserter Mikroskopietechniken die Zelle als Grundeinheit aller Planzen und Tiere postulieren. Die bedeutendste Struktur innerhalb der Zelle stellt der schon im 17.Jahrhundert von Robert Hook entdeckte Zellkern dar.

Der Zellkern enthält ein langes fadenförmiges Molekül, die Desoxyribonukleinsäure (DNA). Diese ist Träger der Erbinformation. Ausgestreckt ist die gesamte DNA eines menschlichen Zellkerns ca. 2,6 m lang. Ein Zellkern besitzt aber im allgemeinen nur einen Durchmesser von etwa 10 µm, so daß die DNA in drei Stufen kompaktiert wird, die Nukleosomen, Chromatin und Chromosomen genannt werden. Wie Untersuchungen der letzten Jahre gezeigt haben, ist diese dreidimensionale Organisation des Genoms wesentlich für die Funktion des Zellkerns. Inwieweit die Transkription und die für die Zellteilung benötigte Replikation von dieser dreidimensionalen Organisation beeinflußt werden, liegt jedoch bis heute weitgehend im Dunkeln.

Aufgrund verschiedener Beobachtungsmethoden wurden seit Beginn des Jahrhunderts verschiedene Modelle für die räumliche Struktur von Zellkernen während der Interphase, in der Gene transkribiert werden, vorgelegt:Rabl und Boveri postulierten 1885, bzw. 1909, zunächst eine Trennung der Chromosomen in Territorien [Ra 85, Bo 09]. Aufgrund von elektronenmikroskopischen Aufnahmen stellte Comings 1968 ein Modell auf, bei dem sich Chromosomen zufällig und ungeordnet über den ganzen Zellkern erstreckten [Co68].
Durch Mikrobestrahlungsexperimente konnte jedoch in den 70er Jahren durch Cremer gezeigt werden, daß Chromosomen im Zellkern lokalisierte Strukturen bilden [Cr 74, Zo 79, Cr 82a, Cr 82b und Cr 84]. 1984 stellten Pienta und Coffey ein Modell auf, das aus ca 100kbp großen Schleifen bestand. Diese Schleifen sollten sich während der Zellteilung zu Rosetten zusammenlagern, aus denen sich wiederum ein Metaphasechromosom aufbaute [PiCo 84].
Mit der Entwicklung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) konnte man 1993 die territoriale Organisation einzelner Chromosomen erstmals sichtbar machen [Cr 93, Zi 93]. 1992 benutzte van den Engh FISH, um räumliche Abstände von DNA-Sequenzen in Chromosomen zu messen [vdE 92]. Es zeigte sich, daß auf Skalen bis 1,5Mbp die dreidimensionale Organisation durch ein Random-Walk-Modell beschrieben werden kann. Der geometrische Abstand ist bei diesem Modell proportional der Quadratwurzel des Genomabstands. Bei größeren Skalen wächst der geometrische Abstand langsamer an.
Sachs stellte daraufhin 1995 ein Random-Walk-Giant-Loop-(RWGL) Modell vor, das dieses Verhalten erklärt [Yo 95]. Ein Chromosomenterritorium besteht dabei aus 3Mbp großen flexiblen Chromatinschleifen, die entlang eines Random-Walk-Backbones lokalisiert sind. Die Verteilung der Chromatinschleifen im Chromosomenterritorium ist bei diesem Modell rein zufällig.
Das von Cremer schon 1993 vorgestellte Inter-Chromosom-Domänen- (ICD) Modell postuliert dagegen einen weit höheren Ordnungsgrad [Cr 93, Zi 93]. Hier wird ein hypothetisches dreidimensionales Netzwerk zwischen den Territorien angenommen. Genreiche DNA-Sequenzen sind an der Oberfläche lokalisiert, genarme dagegen im Innern des Territoriums.

Keines der Modelle ist jedoch in der Lage, die Gesamtheit der experimentellen Daten zu beschreiben. Münkel entwickelte deshalb das sogenannte Multi-Loop-Subkompartment-(MLS) Modell [Mü 98]. Kleine Schleifen aus Chromatin sind dabei zu Rosetten zusammengelagert. Die Rosetten werden wiederum durch eine Verbindung aus DNA miteinander verknüpft, bleiben über den ganzen Zellzyklus erhalten und bilden distinkte Einheiten.

Die genaue dreidimensionale Organisation des Chromatins in Chromosomen ist bis heute unklar geblieben. Elektronenmikroskopische Verfahren besitzen zwar hohe Auflösungen, zerstören durch die verwendete Präparationstechnik aber die dreidimensionale Organisation. Lichtmikroskopische Verfahren sind zwar schonend, besitzen dagegen nicht die notwendige hohe Auflösung.

Hier wurde die dreidimensionale Organisation von Chromosomen in der Interphase simuliert. Da die Organisation im Modell bekannt ist, konnten Observable berechnet werden, die für die Interpretation und Vorhersage von schonenden Experimenten mit geringer räumlicher Auflösung dienten.Durch diese Vorgehensweise konnten die oben genannten Einschränkungen umgangen werden.

Die Simulationen wurden mit Monte-Carlo- und Brownschen-Dynamik-Verfahren durchgeführt.Hauptziel der Simulationen war dabei zunächst die Unterscheidung zwischen RWGL- und MLS-Modell auf kleinen genomischen Skalen. Neben der Simulation ganzer Chromosomenterritorien wurden innerhalb der jeweiligen Modelle verschiedene Parameter, wie z. B. die Schleifengröße oder die Schleifenanzahl, variiert.
Als Observable wurden aus den Simulationen verschiedene dreidimensionale Abstände für den Vergleich mit dreidimensionalen Abständen zwischen genetischen Markern bestimmt. Darüberhinaus wurden weitere Observable gesucht und gefunden (z.B. die radiale Dichte), die es erlaubten, genauer zwischen den Modellen zu unterscheiden.

Um die Simulationen zu verifizieren, wurden Experimente mit hochauflösender konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) unter Verwendung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) durchgeführt. Das Hauptziel bestand dabei in der Messung von Abstandsverteilungen zwischen genomischen Markern der Prader-Labhart-Willi/Angelmann-(PLWS/A) Region auf Chromosom 15. Das PLWS/A Syndrom ist, im Gegensatz zu anderen genetisch bedingten Krankheiten, wahrscheinlich auf die dreidimensionale Organisation von Chromosom 15 zurückzuführen. Für die Experimente wurde eine die Struktur der Zelle schonende Präparation verwendet.

Im Vergleich mit den Simulationen wurde eine Unterscheidung zwischen den Modellen vorgenommen. Weiterhin sollte die genaue Faltungsstruktur der PLWS/A Region bestimmt werden. Hier konnte gezeigt werden, daß mütterliches und väterliches Chromsom wahrscheinlich eine unterschiedliche dreidimensionale Organisation aufweisen.

Im Hinblick auf zukünftige komplexere Fragestellungen bezüglich der Gesamtorganisation des Zellkerns wurde versucht, weitere Analysemethoden und Observable zu finden. Die zugrundeliegenden Prinzipien sollten dabei die biologische Fragestellung mit allgemeingültigen Gesetzen und Organisationsprinzipien aus anderen naturwissenschaftlichen Bereichen in Zusammenhang bringen.

Die Theorie der Fraktale stellte sich dabei als besonders geeignet heraus. Mit ihr lassen sich Phänome und Organisationsprinzipien verschiedenster Systeme vergleichen. So konnte erst kürzlich gezeigt werden, daß Skalierungsgesetze zwischen verschiedenen Säugetieren mit nur drei Annahmen erklärt werden können [WeBrE 97]. Eine dieser Annahmen besteht darin, daß das Transportsysteme (Blutkreislauf) in diesen Säugetieren fraktal ist.
Die Frage war nun, ob es auch im Zellkern ein solch allgemeines Prinzip gibt, das die Organisation erklärt.

Die Ergbnisse der Simulation zeigen dabei nicht nur fraktales, sondern sogar multifraktales Verhalten. Erstmals könnte damit die Fraktalität und Multifraktalität einer zellulären Organisationsstruktur gezeigt worden sein. Erstaunlich ist hierbei die Größenordnung des betrachteten Systems.
In der Zukunft wird es damit möglich sein, weitere Organisationsmerkmale des Zellkerns aufzudecken. Zum Beispiel lassen sich aus der fraktalen Struktur Aussagen über das Diffusionsverhalten gewinnen.

Die Arbeit ist in sechs Kapitel untergliedert: in Kapitel I werden kurz biologische Grundlagen und in Kapitel II die Entwicklung der Zellkernorganisation erläutert. In Kapitel II werden die Simulationen und in Kapitel IV werden die Experimente in ihrer Methodik, Durchführung und Ergebnissen beschrieben. In Kapitel V erfolgt ein Vergleich zwischen den Simulationen und Experimenten. Schließlich erfolgt in Kapitel VI eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

I Biologische Grundlagen

Wie schon in der Einleitung erwähnt, ist die Erbsubstanz in vier hierarchische Organisationsniveaus gegliedert: DNA, Nukleosomen, Chromatin und Chromosomen.In den folgenden Abschnitten sollen diese Organisationsniveaus genauer erläutert werden.

I.1.DNA

Miescher isolierte 1869 als Hauptbestandteil des Zellkerns Desoxyribonucleinsäure (DNA) aus Eiterzellen und Fischspermien [Br 91]. Erst 1944 wurde aber durch O. T. Avery, C. M. MacLeod und M. McCarty durch Transformationsexperimente an Pneumokokken experimentell nachgewiesen, daß die DNA der Träger der Erbinformation ist [Br 91].
DNA ist ein fadenförmiges Makromolekül, ein Polymer, das aus vier Grundeinheiten, den sogenannten Nucleosiden, aufgebaut wird. Die Nucleosiden bestehen aus einem Zucker (ß-D-2´-Desoxyribose) und einer von vier heterozyklischen Basen Adenin (A), Guanin(G), Thymin (T) und Cytosin(C). Die Monomere werden durch eine 3´-5´ Phosphodiester-Bindung zu einem Einzelstrang polymerisiert. Die Basensequenz kodiert die genetische Information, die Zucker und Phosphatgruppen erfüllen primär strukturelle Aufgaben.
Obwohl die chemische Struktur und die Eigenschaften der DNA schon sehr gut bekannt waren, konnte die räumliche Struktur der DNA erst 1953 mit Hilfe von Röntgenstrukturanalysen durch James D. Watson und Francis H. C. Crick, sowie Linus C. Pauling und Rosalind E. Franklin aufgeklärt werden [Pau 86]: Man fand, daß zwei Einzelstränge sich zu einer Doppelhelix zusammenlagern. Zwischen Adenin und Thymin werden dabei zwei und zwischen Guanin und Cytosin drei Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet, so daß die Einzelstränge in der Doppelhelix eine komplementäre Anordnung besitzen (Abb.I.1).
Die Doppelhelix ist rechtshändig um eine gemeinsame Achse gewunden. Die beiden Einzelstränge sind dabei bezüglich ihrer Polymerisierungsrichtung gegenläufig orientiert. Die Phosphat- und Desoxyribosereste befinden sich außen, die Basenpaare befinden sich innen.
Durch diese dreidimensionale Anordnung erlangt die Doppelhelix gegenüber dem Einzelstrang größere Stabilität, die sich in einem höheren Elastizitätsmodul und Torsionsmodul zeigt. Außerdem kann sich zwischen den Basen ein π-System ausbilden [Eb 93].
Die DNA-Doppelhelix zeigt auf der Oberfläche eine schmale und breite Furche, deren Tiefe durch die Kippung der Basenpaare gegen den Helixdurchmesser bestimmt wird. Während in der großen Furche N- und O-Atome mit Proteinen besonders gut wechselwirken können, sind in der kleinen Furche weniger basenspezifische Unterschiede für eine Wechselwirkung mit Proteinen vorhanden.
In biologischen Systemen liegt die DNA meist in einer als B-Form bezeichneten Konformation vor, bei der 10,4 Basenpaare pro Helixwindung auftreten, und besitzt einen Durchmesser von ca. 2,4 nm (weitere Daten befinden sich in Tab.I.1). Weitere Formen sind die sogenannte A- und Z-Form, die unter bestimmten, meist lösungsabhängigen Einflüssen, generiert, nachgewiesen und ineinander umgewandelt werden können (Tab.I.1).

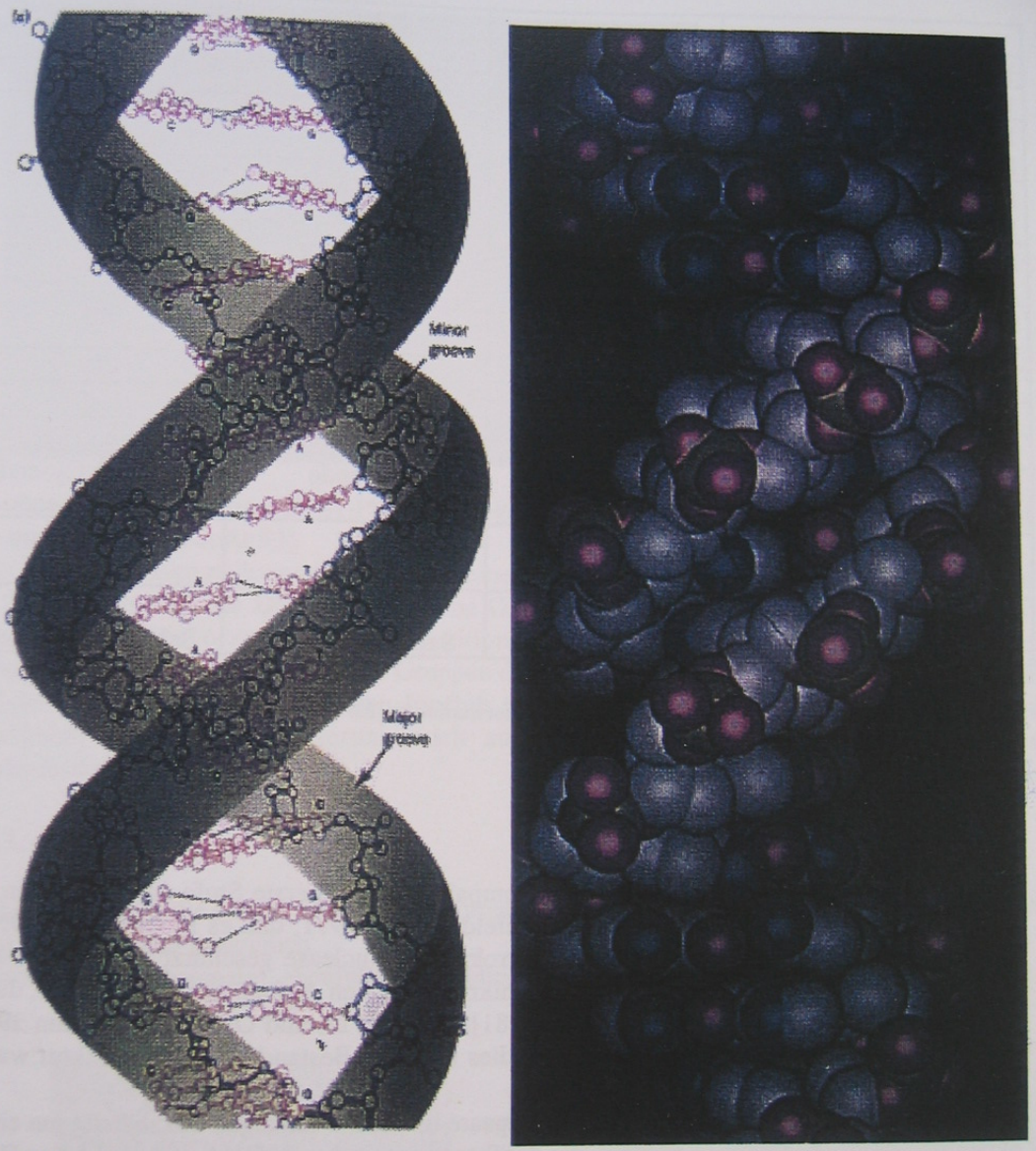


Abb.I.1.:
DNA-Doppelhelix: als Strukturformel links und als Kalottenmodel rechts. Gezeigt ist die Struktur des palindromischen Oktamers GGTATACC, die aus Röntgenstreudaten bestimmt wurde. [VoVo 95].

Die DNA-Kondensation im Zellkern zu hohen Packungsdichten erfordert darüber hinaus eine Flexibilität des Doppelstranges. Bisweilen kann eine Verdrehung der Basen innerhalb eines Basenpaares so weit gehen, daß die Stränge an dieser Stelle bereits teilsepariert sind.

	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
helikaler Drehsinn	rechts	rechts	links
Durchmesser [nm]	ca. 2,4	ca. 2,4	ca. 1.8
Basenpaare pro helikaler Windung [N]	11	10	12 (6 Dimere)
helikale Windung pro Basenpaar [°]	0,33	0,36	0,60 (pro Dimer)
helikale Ganghöhe Anstieg/Windung [nm]	2.8	3.4	4.5
helikaler Anstieg pro Basenpaar [nm]	0,26	0,34	0,37
Basenneigungswinkel [°]	20	6	7
große Furche	eng und tief	breit und tief	flach
kleine Furche	breit und flach	eng und tief	eng und tief
Ribose-Konformation	$C_{3'}$-endo	$C_{2'}$-endo	Pyrimidin: $C_{2'}$-endo Purine: $C_{3'}$-endo
glykosidische Bindung	anti	anti	Pyrimidine: anti Purine: syn
in Lsg. begünstigt durch	K^+, Na^+, Cs^+	geringe Salzkonzentration	hohe Salzkonzentration

Tab.I.1:
Kenndaten der B-DNA sowie der A-und Z-DNA Konformationen [Eb 93].

I.2. Nukleosomen

Nukleosomen stellen in der Hierarchie der Kompaktierung die erste Stufe dar und bilden die Basiseinheit für Chromatin. Clark und Felsenfeld zeigten 1971, daß es in Chromatin DNA-Bereiche gibt, die bei einem Verdau mit Mikrokokken-Nuclease geschützt sind [KoKu 81]. Kornberg fand daraufhin 1973 auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen eine Stuktur, die er „Beads on a String" nannte (Abb.I.2) [KoKu 81]. Eda und Donald Olins zeigten dann 1974, daß die Nukleosomen, die sie zunächst ν-Bodies nannten, Bestandteil dieser Struktur waren [OlOl 74].
Bei Nukleosomen werden nun etwa 170 Basenpaare in 1 3/4 Windungen linkshändig um einen oktameren Proteinkomplex gewunden. Die darüber hinaus gehende DNA, die als Linker-DNA bezeichnet wird, verbindet die Nukleosomen miteinander und ist je nach Organismus bis zu 80 Basenpaare lang. Das Oktamer besteht jeweils aus zwei Proteinen, den sogenannten Histonen, der Klassen H2A, H2B, H3 und H4.
Über die relative Lage der Linker-DNA bei Ein- und Austritt aus der Wicklung (Abb.I.2) entscheidet ein weiteres Protein, Histon H1. Die Funktion von H1 ist zwar umstritten, könnte aber der einer Haarnadel ähneln, über die der Zugang anderer Proteine zur DNA steuerbar ist. Kornberg [KK 81] fand mit Hilfe einer Kombination von Elektronenmikroskopie und Röntgenbeugung, daß das Histonoktamer eine zylindrische Gestalt mit 11 nm Durchmesser und 5.5 nm Höhe besitzt. Die Bindung der DNA erfolgt über elektrostatische Wechsel-

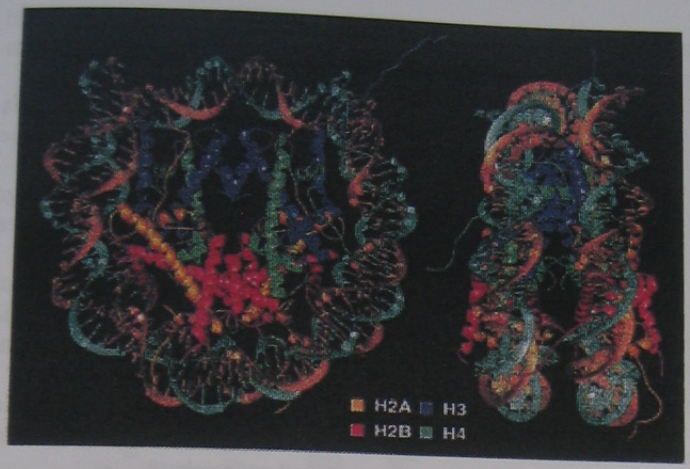


Abb.I.2:
Darstellung der Nukleosomenstruktur mit DNA, in der Aufsicht (links) und in der Seitenansicht (rechts), in einer Wire-Frame Darstellung. [Lug 97].

wirkungen zwischen dem DNA-Phospatrückgrat und 120 positiven Ladungen von Lysin- und Argininresiduen [MoAr 93].
Neueste röntgenkristallographische Aufnahmen von Luger [Lug 97] mit einer Auflösung von 2.8 Å zeigen, daß die DNA hier nur eine Ganghöhe von 10,2bp besitzt. Dies könnte eine Erklärung für bevorzugte Bindungspositionen der DNA an das Oktamer sein. Sie fand weiterhin, daß die aminoterminalen Gruppen der Histonschwänze eine sehr geordnete Struktur bilden. Dies sollte entscheidenden Einfluß auf die Inter-Nukleosomen-Wechselwirkungen ausüben, und über Acetylierung auch auf biologische Regulationsmechanismen der Erbsubstanz.

I.3. Chromatin

Chromatin stellt die zweite Stufe in der Kompaktierungshierarchie von DNA dar und setzt sich aus Nukleosomen zusammen.
Isoliert wurde Chromatin, ebenfalls durch Miescher, bereits 1868. Er nannte es Nuklein.

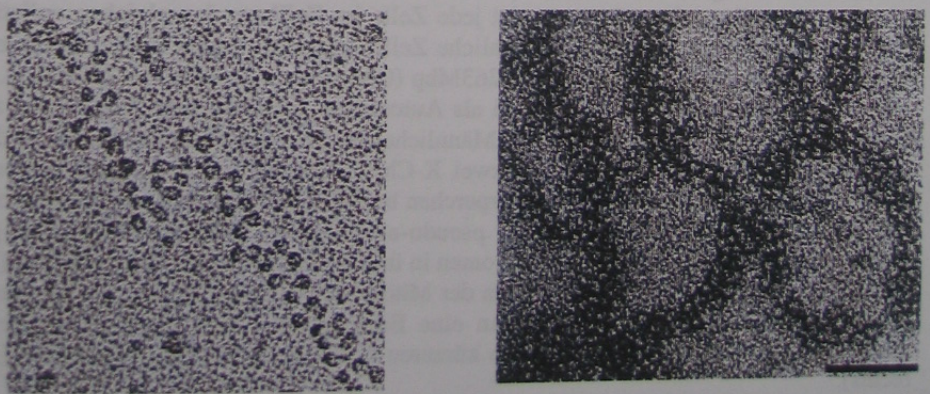


Abb.I. 3:
Links: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Chromatin „Beads on a String" in 5mM Salz [VoVo 95].
Rechts: Elekronenmikroskopische Aufnahme der 30nm Chromatinfaser [VoVo 95].

Wie oben erwähnt, reihen sich Nukleosomen wie Perlen zu einer Kette auf. Bei Salzkonzentrationen im physiologischen Bereich kondensieren sie zu einer Faser mit ca. 30nm Durchmesser. Bis heute wurden 3 Modelle für den Aufbau dieser 30nm-Faser vorgeschlagen: Im Solenoidmodell sind 6 Nukleosomen in einer Helixwindung zusammengelagert. Die Helix soll dadurch gebildet werden, daß gleiche Kräfte zwischen den Nukleosomen eine gleichmäßige Überstruktur bilden.
Das Superbead-Modell von Zentgraf und Franke [ZeFr 84] schlägt hingegen regelmäßige Ansammlungen von 6 bis 48 Nukleosomen vor, wobei die in schonenden Präparationen erhaltenen Fasern aus diesen sogenannten Superbeads bestehen sollen.
Eine Alternative dazu wäre das von vielen Autoren [vHZ 95, WoHo 95; siehe dort weitere] aus experimentellen und theoretischen Daten vorgeschlagene 3D-Zick-Zack-Modell. Die Nukleosomen folgen hier beim Aufbau der 30nm-Faser einem zickzackförmigen Weg und nicht einer Helix (Abb.I.3, links).
Generell läßt sich Chromatin in zwei Klassen einteilen, die sich in der Packungsart unterscheiden: Heterochromatin ist inaktiv und besitzt keine oder nur wenige Gene. Euchromatin ist dagegen aktiv oder in aktionsbereitem Zustand und genreich.

I.4. Chromosomen

Chromosomen (griech.: Farbkörper) als größte strukturelle Einheit im Kern und die dritte Kompaktierungstufe von DNA wurden zunächst durch C. W. Nägeli (1842) und W. Hofmeister (1848) beobachtet. Anfang der 70er Jahre des 19. Jahrhunderts wurden sie durch Färbemethoden als eigenständige Struktur im Zellkern erkannt, erhielten jedoch erst von Waldeyer 1888 ihren Namen [Wa 88, Br 91]. Durch die damaligen Färbemethoden und Beschränkungen bei der Auflösung der Mikroskopieverfahren konnten Chromosomen jedoch nur während der Mitose untersucht werden. Mit Mitose bezeichnet man das Zellstadium, in dem sich die Zelle teilt. Die Chromosomen stellen in der Mitose definierte Gebilde dar (Abb.I.4), die in die beiden Tochterzellen transportiert werden. Schon damals wurde darüber diskutiert, ob Chromosomen zeitlich begrenzte Einheiten sind oder ob sie jedes Mal zu Begin der Mitose neu gebildet werden. Unklar war vor allem, ob sie in der Interphase (das Stadium zwischen Zellteilungen) eine definierte Struktur beibehalten.
In einem vielzelligen Organismus weist jede Zelle im Zellkern den gleichen vollständigen Chromosomensatz auf. Normale menschliche Zellen enthalten 2 mal 23 Chromosomen, die zwischen 50Mbp (Chromosom 21) und 263Mbp (Chromosom 1) enthalten (TabIII.1). Die 22 homologen Paare bezeichnet man dabei als Autosomen, während man die übrigen zwei als Geschlechts-Chromosomen bezeichnet. Männliche Säugerzellen enthalten ein X- und ein Y-Chromosom, während die weiblichen zwei X-Chromosomen besitzen. Eines der beiden X Chromosomen, das auch oft als Barr-Körperchen bezeichnet wird, ist in weiblichen Zellen fast vollständig inaktiv (mit Ausnahme der pseudo-autosomalen Region). Untersuchungen von Dietzel belegen, daß sich beide Chromosomen in ihrer Faltungsstruktur unterscheiden [Ku 96]. Während der Metaphase, die ein Stadium der Mitose repräsentiert, lagern sich die Autosomen paarweise zusammen. Dabei stellt man eine Einschnürung fest, die man als Zentromer bezeichnet, und das Chromosom in den kürzeren p- und den längeren q-Arm teilt (Abb.I.4, rechts).
Durch spezielle Färbetechniken [Fr 94] lassen sich bei Chromosomen in der Metaphase Querbanden-muster (Ideogramme; Abb.I.6, links; Abb.III.5) sichtbar machen. Im allgemeinen

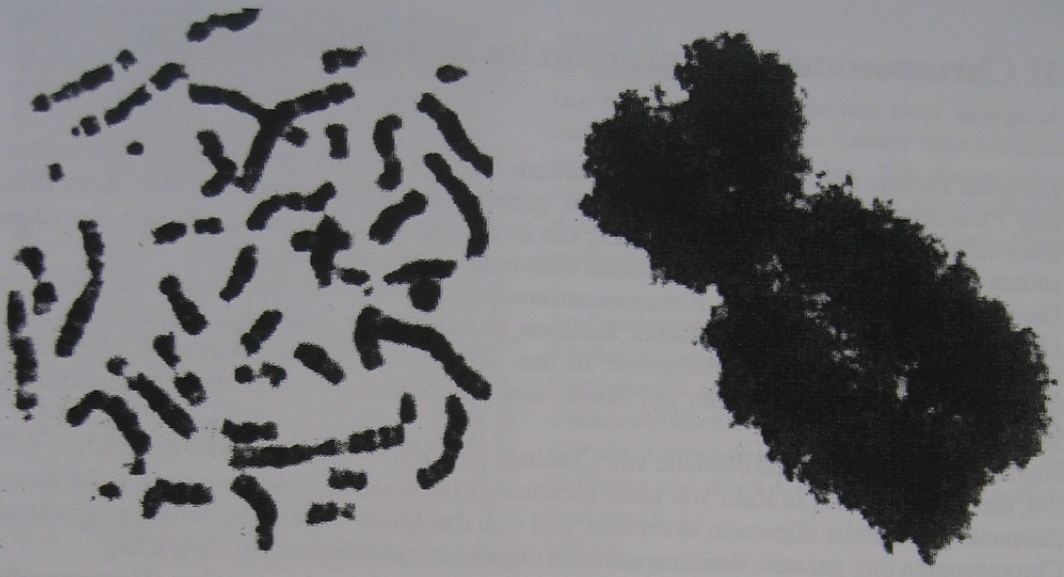


Abb.I.4:
Links: Metaphaseplatte, Giemsa gefärbte Ideogrammbanden. [Al 94].
Rechts: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Metaphasechromosoms. [BIFa].

wird dieses Muster auf den unterschiedlichen Adenin- und Thymin-Gehalt und den Zeitpunkt, in denen Gene in diesen Bereichen repliziert werden, zurückgeführt. Als G-Banden werden dabei Banden bezeichnet, die hohen Adenin- und Thymin bzw. Gen-Gehalt aufweisen und früh replizieren. Mit R-Banden werden die restlichen Banden bezeichnet [Co 78]. Kürzlich konnten diese Muster auch für die Interphase nachgewiesen werden [Zink unpublished], so daß also Teile der Chromosomenstruktur der Mitose auch in der Interphase erhalten sind.

Bis heute ist jedoch die dreidimensionale Organisation von Chromosomen nicht bekannt. Die verschiedenen Modelle, die diese Faltung des Chromatins beschreiben, werden in Kapitel II näher erläutert.

II Chromosomenorganisation im Interphasezellkern

Die erste Theorie der Zellkernstruktur postulierte Rabl 1885 unter der Annahme, daß in Tier- und Pflanzenzellen eine strukturelle und genetische Identität während des Zellzyklus beibehalten wird [Bo 09]. Chromosomen, die in der Metaphase distinkte Objekte darstellen, sollten auch während der Interphase solche definierten Territorien einnehmen.
Die mit dem Aufkommen der Elektronenmikroskopie verbundene Hoffnung, die einzelnen Chromosomen im Interphasezellkern auflösen zu können, erfüllte sich jedoch auch nicht während der zahlreichen Experimente in den 1960er und 1970er Jahren. Lediglich die beobachtete Feinstruktur schien auf lange, sich im Zellkern bewegende Chromatinfasern hinzudeuten.
Hieraus entstanden u. a. die Modelle von Comings [Co 68], sowie Vogel und Schroeder [VoSc 74], die im Gegensatz zu Rabl von einer nichtterritorialen Organisation ausgingen. Zu diesem Zeitpunkt war bereits allgemein akzeptiert, daß sich das Euchromatin vollständig entpackt und Chromosomen ihre gesamte dreidimensionale Organisation verlieren [St 77, Wi 73].
Hauptsächlich Mikrobestrahlungsexperimente an lebenden chinesischen Hamsterzellen sprachen jedoch in der zweiten Hälfte der 70er und den frühen 80er Jahren für eine territoriale Organisation der Chromosomen in der Interphase [Cr 74, Zo 79, Cr 82a, Cr 82b und Cr 84].
Mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) mit zusammengesetzten chromosomenspezifischen DNA Sonden gelang schließlich 1988 der endgültige Nachweis von Chromosomenterritorien im Interphasezellkern [Cr 88, Li 88, Pi 88 und für einen Überblick Cr 93].
Als Modell wurde hierauf durch Cremer [Cr 93] und Zirbel [Zi 93] das Inter-Chromosom-Domänen (ICD) Modell vorgeschlagen. Hier wird ein Netzwerk von Zwischenräumen, die durch negative Ladung der Chromosomenoberflächen , postuliert.
Die genaue dreidimensionale Organisation von Chromosomen blieb allerdings weiterhin unbekannt, obwohl man ihr große Bedeutung für die Funktion des Genoms zuschrieb.
Schon 1984 hatten deshalb Pienta und Coffey ein detailreicheres Modell für Metaphasechromosomen vorgeschlagen. Metaphasechromosomen sollten dabei aus Chromatinschleifen bestehen, die zu Rosetten zusammengelagert sind. In der Interphase sollten sich diese Rosetten aber wieder in einzelne Schleifen auflösen.
Mit der Weiterentwicklung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung konnte van den Engh [vdE 92] schließlich zeigen, daß man Genom-Abstände von DNA Sequenzen mit Hilfe eines Random-Walk-Giant-Loop (RWGL) Modells beschreiben kann.
1997 schlug Münkel das Multi-Loop-Subkompartment Modell (MLS) vor, das die experimentellen Daten besser erklärte als die bisherigen Modelle. Es stellt eine Weiterentwicklung des Modells von Pienta und Coffey, sowie des RWGL-Modells dar.

Die einzelnen Modelle werden in den folgenden Abschnitten genauer erläutert.

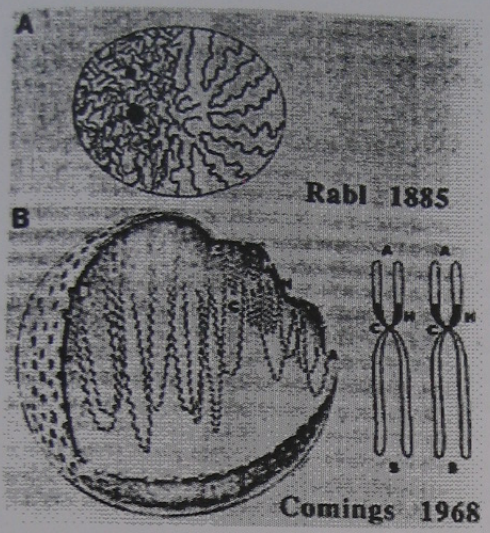


Abb.II.1:
A: Rabls Modell:
Der Ort und die Orientierung jedes Interphasechromosoms ist durch den Verlauf eines primären Kernfadens (rechts) gegeben. Von diesem gehen sekundäre und tertiäre Fäden als laterale Projektionen aus (links), die das dreidimensionale Chromatinnetzwerk im Interphasekern bilden.

B: Comings Modell:
Die Befestigungspunkte der Chromatinfaser sind im Euchromatin weit, im Heterochromatin (H) eng zusammen. Die Chromosomen sind polarisiert, d. h. daß die Zentromere (C) sich auf einer Seite des Zellkerns und die Telomere sich auf der anderen befinden (B, A).
[Cr 93].

II.1 Modell von Rabl (1885) und Boveri (1909):

Aufgrund von lichtmikroskopischen Untersuchungen an Zellen von Salamandra maculata und Proteus Zellen veröffentlichte Carl Rabl 1885 seine Theorie über die interne Struktur des Interphase-Zellkerns. Chromosomen behalten in dieser Theorie ihre Anaphase-Telophase-Orientierung während der folgenden Interphase bei (Abb.II.1, A). Nach diesem Modell gehen von einem primären Kernfaden dabei sekundäre und tertiäre Fäden als laterale Projektionen aus, wobei sie das dreidimensionale Chromatinnetzwerk des Interphasezellkerns bilden. Die primären Kernfäden gehen von einem sogenannten Polfeld aus, das auf der einen Seite des Zellkerns lokalisiert ist und in dem sich die Zentromere bevorzugt aufhalten. Die Kernfäden laufen bevorzugt entlang der Kernhülle und enden auf der Gegenpolseite. Die Telomere der Chromosomen enden an den Kernhüllen.
Theodori Boveri erweiterte dieses Modell dahingegen, indem er spekulierte, daß die Chromosomen bestimmte Territorien einnehmen [Ra 85, Bo 09].

II.2 Modell von Comings (1968):

Durch die Entwicklung der Elektronenmikroskopie und die Möglichkeit, nun mit hoher Auflösung die Topologie des Zellkerns zu erforschen, gelangten Comings [Co 68] und andere allerdings zu davon abweichenden Modellen (Abb.II.1, B):
Die Chromosomen sind so an der Kernhülle, den Nucleoli und an einer internen Kernmatrix befestigt, daß sie relativ genau definierte Positionen im Zellkern während der Interphase einnehmen. Entzieht man durch mehrmaliges Waschen in NaCl (2M) dem Zellkern einen Großteil der DNA und Histone, so bleibt eine sogenannte Kernmatrix übrig, an der bei unvollständiger Präparation der größte Teil (abgesehen von der Kernmembran) des Chromatins befestigt ist. Die Lokalisation von Euchromatin im zentralen Bereich nahe der Kernmatrix und von Heterochromatin im Bereich der Kernhülle unterstützt diese These. Ein weiterer Hinweis ist, daß man frühreplizierende DNA nahe der Kernmatrix, spätreplizierende dagegen im

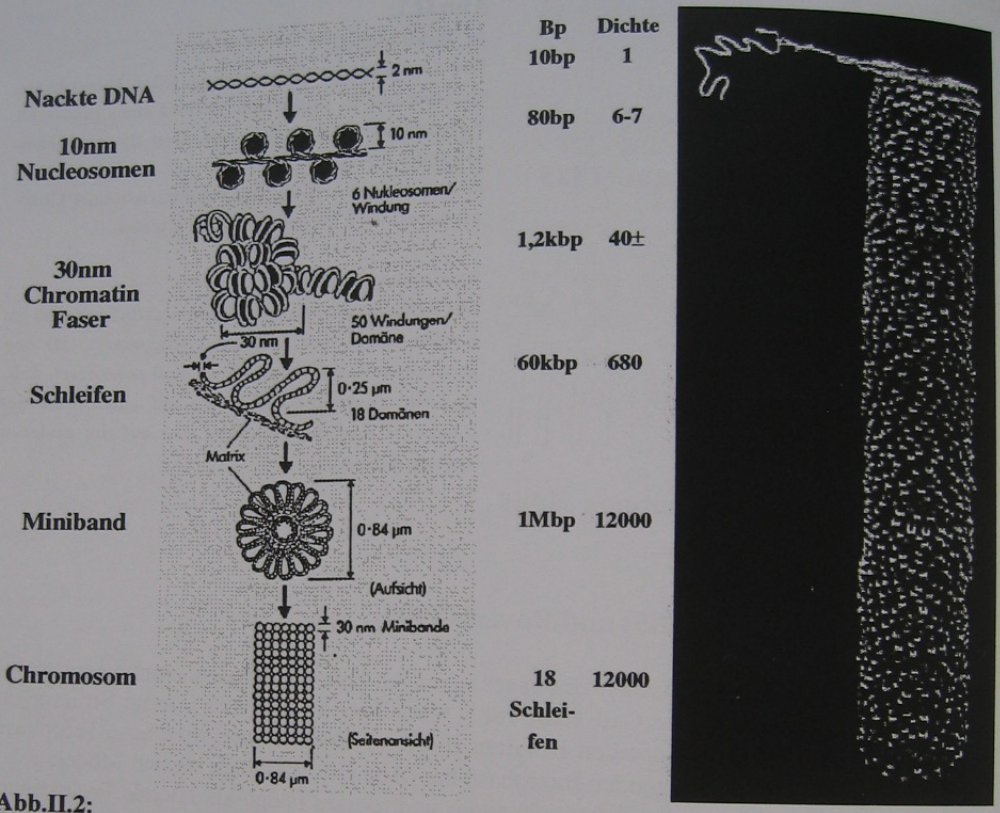


Abb.II.2:

Schematische Darstellung der verschiedenen Ebenen der DNA-Organisation und des Modells von Pienta und Coffey. Von links nach rechts:
Ebenen der DNA-Organisation mit Schemazeichnung. Basenpaare pro Windung. Kompaktierungskoeffizient pro Ebene. Skalenmodell eines humanen Metaphasechromosoms 4, ohne Zentromer, mit 1908 Schleifen in 106 Minibändern a 18 Schleifen zu 60kbp. Die weiße Faser entspricht der 30nm Chromatin-Faser. Das Modell ist 26,5cm lang und äquivalent zu einem Chromosom von 3,19µm Länge.

peripheren Bereich fand. Comings bestätigte die von Rabl aufgestellte Annahme über die Polarisation der Interphase-Chromosomen.

II.3 Modell von Pienta und Coffey (1984):

Ausgehend von dem Modell von Comings entwickelten Pienta und Coffey aufgrund eigener und anderer Studien 1984 [PiCo 84] ein Modell mit wesentlich höherem Organisationsgrad (Abb.II.2).
Vogelstein visualisierte 1980 DNA-Schleifenstrukturen, die an die Kernmatrix gebunden sind, durch Entspannen von superhelikalen Schleifen mit einer niedrigen Konzentration Ethidiumbromid (5µg/ml) [Vo 80]. Die Visualisierung dieser DNA erzeugt dabei einen sogenannten Halo um die Peripherie der Kernmatrix. Aus der Größe dieses Halos wurde der DNA-Gehalt einer DNA-Schleife zu ca. 90.000 Basenpaaren bestimmt.

Sollten diese Schleifen an einem Basispunkt an der Kernmatrix befestigt sein, so sollte sich bei hohen Konzentrationen von Ethidiumbromid (100ug/ml) die ursprüngliche Struktur wieder ausbilden [BeWo 76]. Vogelstein konnte dies ebenfalls 1980 zeigen [Vo 80]. Besaß die DNA dagegen Einzelstrangbrüche, trat der Effekt nicht ein, was die Hypothese endgültig zu bestätigen schien.
Während Paulson und Laemmli [PaLa 77] bereits ähnliche Schleifen fanden, wurde die Bedeutung der Kernmatrix durch Experimente von Pardoll [Pa 80] gesteigert, der zeigen konnte, daß in diesen Halos Replikation stattfindet. Es war dabei auch möglich, zeitaufgelöste Studien mit Hilfe der Autoradiographie gewinnen.
Die erste einfache Überlegung von Pienta und Coffey bestand nun darin, die DNA-Schleifen nur während der Replikation als freie DNA-Schleifen anzusehen und sie für den übrigen Zeitraum, sicher jedoch für die Metaphase, als kondensiertes Chromatin zu betrachten. Durch Mittelung über alle verfügbaren veröffentlichten Daten (genauere Übersicht in [PiCo 84] versuchten sie nun, allgemeine Daten für die Schleifenstruktur im Kern zu erhalten. Diese wurden in die Metaphase hinein extrapoliert. Ein Vergleich mit bereits existierenden Vorstellungen ergab nur eine sinnvolle Übereinstimmung mit dem Radial-Loop-Modell von Marsden und Laemmli [MaLa 79] bzw. Adolph und Kreisman [AdKr 83] für die Metaphase.
Chromosom 4 besteht demzufolge aus ca. 106 Minibändern, die wiederum jeweils ca. 18 Schleifen aus Chromatin enthalten, was die gemessene Metaphasenausdehnung sehr gut wiedergab. Mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen, in denen man die Schleifenanzahl pro Chromatidwindung zählte [Ut 81, Ad 80, La 79 und Du 70], konnte dies in etwa bestätigt werden.
Zusammen mit weiteren Ergebnissen von Cook [Cook 76] schlossen Pienta und Coffey, daß, obwohl man in der Interphase keine Strukturen direkt sichtbar machen konnte, DNA-Schleifen erhalten bleiben. Die Minibänder liegen hier wahrscheinlich in aufgelöster Form vor. Die Kondensation bzw. die Dekondensation zu Minibändern sollte auf chemomechanischen Wechselwirkungen beruhen.

II.4 Inter-Chromosom-Domänen (ICD) Modell (1990-1996):

Die territoriale Organisation der Chromosomen im Interphasezellkern konnte 1988 mit Hilfe neuer leistungsfähigerer konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung erstmals sichtbar gemacht werden [Cr 93, Zi 93]. Dies bestätigte die Hypothese von Rabl und Boveri. Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß aus den relativ kompakten Territorien weit ausgedehnte, mit aktiven Genen besetzte Chromatinschleifen herausragen [KoCo 88].
Neuere Daten von R. Eils [Ei 95] unter Verwendung von dreidimensionalen Voronoi-Berechnungen von FISH-markierten Chromosomen zeigen, daß die Chromosomenterritorien sich nur in einem recht kleinen Randbereich überlappen. Dies bestätigen auch Untersuchungen, bei der die Lage FISH-markierter Gene relativ zum Territorium [Cr 93, Ku 96, Di 97], bzw. die Lage der Chromosomenarme und Chromosomenbanden bestimmt wurde. Die Entstehung dieser Territorien kann jedoch bis heute noch nicht erklärt werden.
Erklärungsmodelle, die eine große Kernmatrix verwenden (siehe z. B. Comings), besitzen den Nachteil, daß die Komponenten (Strukturproteine) der Matrix bisher nicht gefunden werden konnten [Dr 95, Mat 97]. Maniotis [Ma 97] beschrieb jedoch kürzlich Experimente mit Mikromanipulatoren und Videomikroskopie, die auf ein kraftübertragendes Netzwerk im Zellkern und im Cytoplasma schließen lassen, das, wie die Autoren glauben, aus DNA besteht.

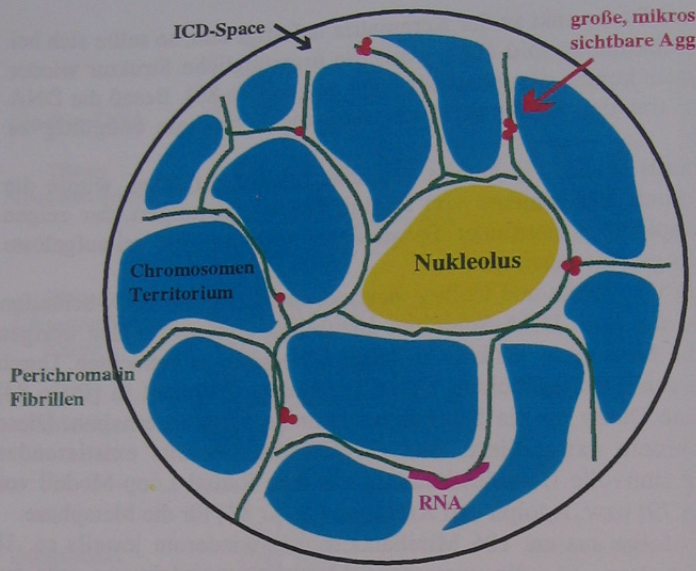


Abb.II.3:
Schematische Darstellung des ICD-Modells:
Zwischen den Territorien befindet sich der ICS-Raum, in dem der Transport von Proteinen, Replikation und Transkription stattfinden soll.
[Cr 93, Zi 93]

Das ICD-Modell (Abb.II.3) beruht nun auf der Vorstellung, daß durch kurzreichweitige elektrostatische Kräfte, sogenannte Donnan-Potentiale, zwischen den Chromosomenoberflächen ein dreidimensionaler Zwischenraum entsteht, das den Kern als Netzwerk durchzieht.
In diesem Netzwerk sollen neben dem m-RNA-Transport zu den Kernporen solch wichtige Prozesse wie DNA-Replikation, Transkription, Splicing und Reparaturprozesse stattfinden. Die Oberflächen der Chromosomenterritorien erlangen damit große funktionelle Bedeutung.

II.5 Random-Walk-Giant-Loop-(RWGL) Modell (1992-1997)

Cremer und Zirbel konnten 1988 zeigen, daß Chromosomen der visuellen Beobachtung zufolge offenbar voneinander getrennte Interphaseterritorien einnehmen. Über die Organisation dieser Territorien auf genomischen Längenskalen von 5Mbp bis 300Mbp und speziell unter 5Mbp konnten jedoch nur Vermutungen angestellt werden. Das Modell von Pienta und Coffey hatte zwar Schleifenstrukturen gefordert, welche aber in der Interphase bis jetzt nicht nachweisbar sind.
1992 benutzte van den Engh FISH, um in lateralen Projektionen Genom-Abstände von DNA-Sequenzen in Interphase-Chromosomen zu messen [vde 92]. Die Messungen wurden an menschlichen Fibroblasten-Zellen in der G0/G1 Phase durchgeführt. Die genomischen Klonabstände variierten zwischen 0.1Mbp und 4Mbp. Unter den gewählten Präparationsbedingungen ergab sich dabei eine Organisation, bei der die Chromatinfaser einem zufälligen Weg folgte. Der geometrische Abstand zwischen zwei markierten Punkten auf einem Chromosom war deshalb proportional zur Quadratwurzel des Genomabstandes (Abb.II.4).
Für Genomabstände, die größer als 1.5Mbp waren, ergab sich jedoch ein langsameres Anwachsen des gemessenen geometrischen Abstandes, oder er wurde schließlich sogar davon unabhängig [Tr 91]. Während Hahnfeldt [Ha 93] diese Abweichungen durch die Einbettung

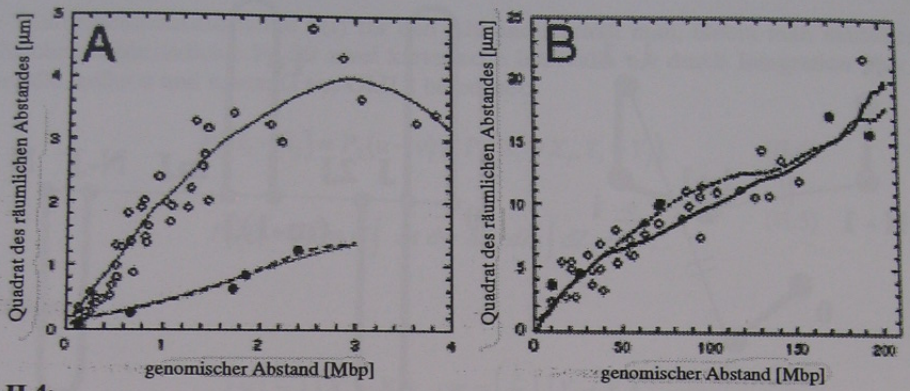


Abb.II.4:
Daten von Yokota [Yo 95]. Offene Kreise: Hypertonische Präparation. Volle Kreise: isotonische Präparation.
A: Quadrat des mittleren räumlichen Abstandes für kleine genomische Abstände.
B: Quadrat des mittleren räumlichen Abstandes für große genomische Abstände.

der Interphasechromosomen in kugelförmige Domänen erklärte, schlug Ostashevsky [Os 94] vor, daß die Chromatinfaser in mehrere Mbp große Schleifen gefaltet ist. Abstandsmessungen von Yokota 1995 [Yo 95] für Genomabstände von 0.15Mbp bis 190Mbp auf den Chromosomen 4, 5 und 19 führten zu der Folgerung von Sachs [Sa 95], daß es wahrscheinlich nur zwei Ebenen der Chromatinorganisation auf Skalen bis 200Mbp gibt. Als einfachste Interpretation ergibt sich eine Organisation von flexiblen Chromatinschleifen von einer Größe zwischen 1Mbp und 5Mbp, deren Befestigungspunkte entlang eines Random-Walk-Backbone plaziert sind, der aus Proteinen, ähnlich denen der Kernmatrix bestehen soll,.
Diese Vorstellung ist aufgrund der mittleren Ausdehnung des Backbones (Gl.II.13, siehe Unten) mit der Ausbildung von Territorien vereinbar. Dies läßt aber eine systematische Kompartimentalisierung von genreichen und genarmen Unterregionen im Territorium nicht zu. Korrespondierende Schleifen können daher mit gleicher Wahrscheinlichkeit im Inneren wie an der Peripherie des Territoriums gefunden werden. Dies steht zu den Ergebnissen des ICD-Modells in klarem Widerspruch. Wahrscheinlich ist die verwendete Auflösung der bisher verwendeten FISH und Laser-Scanning-Mikroskopie-Verfahren nicht groß genug, oder die Feinstruktur der Chromosomenterritorien wird durch die Präparation beeinflußt. Die beiden postulierten Ebenen der Chromatinstruktur sollen im weiteren nun näher beschrieben werden.

II.5.1 Random-Walk-Modell von 0.1 bis 1.5Mbp

Das von van den Engh beobachtete Verhalten entspricht dem Abstandsverhalten eines Polymermodells, das zur Beschreibung von großen, flexiblen, linear aufgebauten Molekülen verwendet wird. Spezifische lokale Strukturen auf kleine Skalen werden durch ein gemitteltes Verhalten auf großem Skalenbereich angenähert. Die Chromatinfaser wird als Folge von Segmenten angenähert, die in gleichen Genomabständen lokalisiert sind.
Die Größe des statistischen Segmentes freier DNA beträgt ca. 1000 Basenpaare, während dies bei der 30nm Chromatinfaser ca. 10kbp bis 100kbp ist [Ha 93, Os 94]. Deshalb wird für die Segmente ein Wert von 100kbp als sinnvoll angenommen (Abb.II.5, links).
Für die Ableitung des Zusammenhangs der Projektion des geometrischen Abstandes mit dem genomischen Abstand werden die Segmentpositionen in kartesischen Koordinaten X_i, i = 0, 1, ... , N beschrieben. Die Z-Koordinate stimmt mit der Strahlrichtung im Mikroskop überein.

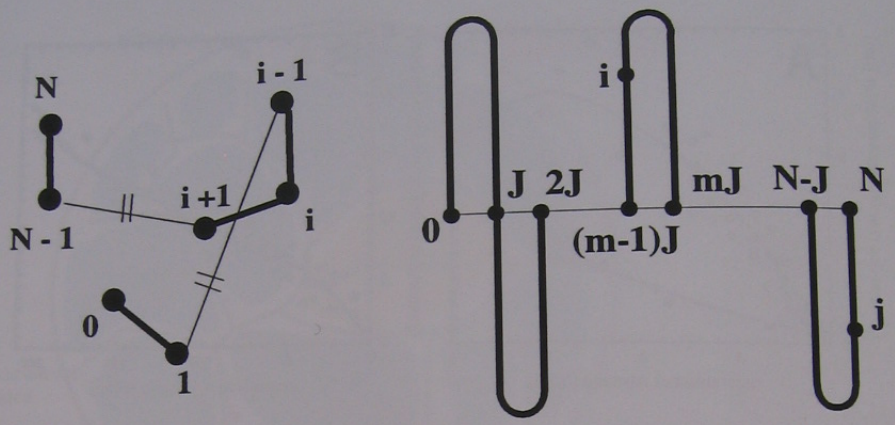


Abb.II.5: Mathematisches Modell des RWGL-Modells
Links: Bereich von 0,1Mbp bis 1,5Mbp. Die Segmente (0 bis N) dieses Modells sind entlang der Chromatinfaser in gleichen Genomabständen lokalisiert. Die Segmente 0 und N bezeichnene die Telomere. Die Abbildung zeigt die Projektion dieser Segmente auf die XY-Ebene.
Rechts: Bereich von 2Mbp bis 200Mbp. Schleifen mit J Segmenten sind an den Punkten 0, J, 2J, etc. mit dem Backbone verbunden. Die Segmente i, j bezeichnen mit FISH markierte DNA-Sequenzen.

Die folgenden Rechnungen betreffen somit nur die (X,Y)-Ebene. Die Komponenten können wie folgt beschrieben werden:

$$\vec{X}_i = (X_i, Y_i, Z_i) = (\vec{x}_i, Z_i). \qquad \text{(II.1)}$$

Man kann die statistische Segmentposition von Polymeren nun als Zustände eines mechanischen Systems betrachten. Für eine bestimmte Segmentanordung im thermischen Gleichgewicht ergibt sich folgende Wahrscheinlichkeitsdichte in Form einer Boltzmannverteilung:

$$G(\vec{X}_0,\ldots,\vec{X}_N) = Ce^{\frac{-U}{k_B T}}. \qquad \text{(II.2)}$$

C: *Normierungskonstante*

$U(\vec{X}_0,\ldots,\vec{X}_N)$: *potentielle Systemenergie*

k_B: *Boltzmannfaktor*

T: *Systemtemperatur*

Gemäß dem Genomabstand für zwei markierte Genomsequenzen wird nun ein entsprechendes Segmentpaar i,j gewählt und die Projektion des geometrischen Abstandes r zu

$$\vec{X}_i = \sqrt{(X_i - X_j)^2 + (Y_i - Y_j)^2} = \|\vec{x}_i - \vec{x}_j\| \qquad \text{(II.3)}$$

bestimmt.

Die Wahrscheinlichkeitsdichte P(r) für den Abstand r erhält man, indem man zunächst die Wahrscheinlichkeitsdichte P_2 für zwei kartesische Intervalle u,v durch Integration über alle Intervalle, außer u und v, von G aus Gl.II.2 berechnet:

$$P_2\left(\vec{x}_i - \vec{x}_j\right) \equiv P_2(u-v) \equiv P_2\left(X_i - X_j, Y_i - Y_j\right), \qquad \text{(II.4)}$$

$$P_2\left(\vec{x}_i - \vec{x}_j\right) = C\int ds\, dw\, dZ_i\, dZ_j \int dZ_i\, e^{\frac{-U}{k_B T}} . \qquad \text{(II.5)}$$

Hierbei ist:

$$s = \left(\frac{1}{2}\right)\left(X_i - X_j\right), \quad w = \left(\frac{1}{2}\right)\left(Y_i - Y_j\right). \qquad \text{(II.6)}$$

Die potentielle Energie U = U_0 mit

$$U_0 = \left(\frac{\kappa_o}{2}\right)\sum_{j=1}^{N}\left\|\vec{X}_i - \vec{X}_j\right\|^2, \qquad \text{(II.7)}$$

beschreibt die Wechselwirkung zwischen benachbarten Segmenten, wobei die nominale Federkonstante κ_0 über alle Beiträge der Chromatinstruktur in kleineren Skalenbereichen summiert. |i-j| ist hierbei der projizierte Genomabstand der Segmente i und j, die durch n Segmentlängen voneinander getrennt sind.
Somit ergibt sich aus Gl.II.5 mit II.7 die Gaußform:

$$P_2\left(\vec{x}_i - \vec{x}_j\right) = \left(\frac{\pi}{\Gamma}\right) e^{\frac{-\left\|\vec{x}_i - \vec{x}_j\right\|}{2\Gamma}}, \qquad \Gamma = \frac{k_B T|i-j|}{\kappa} . \qquad \text{(II.8)}$$

Mit Hilfe der für zwei Dimensionen angenäherten Jakobigleichung

$$P(r) = rdr\int_0^{2\pi} d\theta P_2(r\cos\theta, r\sin\theta), \qquad \text{(II.9)}$$

erhält man nun die Rayleigh-Wahrscheinlichkeitsdichte P(r) für Genomabstände von 0.1Mbp bis 1.5 Mbp:

$$P(r) = \left(\frac{r}{\Gamma}\right) e^{\frac{-r^2}{2\Gamma}} . \qquad \text{(II.10)}$$

Der mittlere Abstand <r> beträgt dann:

$$\langle r \rangle = \int_0^\infty r P(r) dr = \sqrt{\left(\frac{\pi\Gamma}{2}\right)}, \qquad \text{(II.11)}$$

bzw.

$$\langle r^2 \rangle = \int_0^\infty r^2 P(r) dr = 2\Gamma, \qquad \text{(II.12)}$$

so daß also das Quadrat des projizierten, mittleren Abstandes $\langle r^2 \rangle$ zweier Segmente proportional zu ihrem Genomabstand ist.
Die allgemeine Beziehung für einen uneingeschränkten Random Walk lautet für $n \to \infty$

$$\langle r^2 \rangle = b^2 n, \qquad \text{(II.13)}$$

wobei n die Anzahl der Segmente der Länge b bezeichnet [Doi 88].

II.5.2 Random-Walk-Giant-Loop-(RWGL) Modell von 2 bis 200Mbp:

Würde die Chromatinstruktur eines Chromosoms über den gesamten Bereich von 0.1Mbp bis 200Mbp hinweg einem Random Walk folgen, würde der Abstand $\langle r^2 \rangle$ nach Gl.II.13 auch im gesamten Bereich linear vom Genomabstand n abhängen. Yokotas Meßergebnisse lassen sich zwar mit einer Geraden der Steigung 2.15 μm^2/Mbp im Bereich von 0.1Mbp bis 0.15Mbp annähern, im Bereich größer als 2Mbp beträgt die Steigung jedoch nur noch 0.081 μm^2/Mbp (Abb.II.4). Sachs folgerte daraus, daß es noch zusätzliche Wechselwirkungen zwischen Segmenten, die weiter auseinanderliegen, geben muß (Abb.II.6).
Der Wechsel der Geradensteigung entspricht dem Übergang von einem Zufallsweg (Random Walk) bei kleineren Skalen zu einem dichteren bei größeren Skalen, der sich am besten durch ein Modell mit großen Schleifen (Giant Loop) beschreiben läßt. Das Modell besteht nun der Einfachheit halber aus Schleifen gleicher Länge (3,13Mbp), die entlang eines Random Walk lokalisiert sind (Abb.II.5, rechts). Die Segmente des Random-Walk-Weges, welche durch 0, J, 2J, . . ., (m - 1)J, mJ, . . ., N - J, N beschrieben werden, sind gleichzeitig die Befestigungspunkte am Backbone. Ihr Abstand ergibt sich mit der experimentellen Regression 0.081 μm^2/Mbp und Gl.II.13 zu ca. 620nm. Die Segmente i und j bezeichnen mit FISH markierte DNA Sequenzen. Für eine formale Herleitung des physikalischen Abstandes dieser beiden Segmente muß in Gl.II.2 der potentiellen Energie U außer U_0 noch ein weiterer Wechselwirkungsterm

$$U = U_0 + U_1 = \left(\frac{K_0}{2}\right) \sum_{j=1}^{N} \left\| \vec{X}_i - \vec{X}_j \right\|^2 + \left(\frac{K_1}{2}\right) \sum_{m=1}^{N/J} \left\| \vec{X}_{mJ} - \vec{X}_{(m-J)} \right\|^2 \qquad \text{(II.14)}$$

hinzugefügt werden.
Wenn N/J die Gesamtzahl der Schleifen beschreibt, dann bezeichnet dieser Term die Wechselwirkung benachbarter Befestigungspunkte, also die Wechselwirkung zwischen dem Segment 0 und J, bzw. J und 2J bis (N - J) und N. U_0 ist wieder der Wechselwirkungsterm zwischen benachbarten Segmenten und k_2 eine Konstante größer 0 für den Random Walk. Für den Erhalt des Abstandes zwischen den zwei markierten Segmenten i,j muß wieder die

Wahrscheinlichkeitsdichte P(r) mit Gl.II.14 und einer etwas anderen Konstante Γ berechnet werden, die die in Gl.II.12 gezeigte Rayleighform besitzt.

II.5.3 Uneindeutigkeit des Random-Walk-Giant-Loop-Modells :

1997 zeigte Bing Liu [LiSa 97] die Nichteindeutigkeit des Sachsschen Modells. Die Meßergebnisse von Yokota [Yo 95] lassen sich auch durch ein Modell mit zumindest zwei Random-Walk-Backbones beschreiben. Hierfür muß nun ein zweiter Ergänzungsterm in der Gleichung für die potentielle Systemenergie eingeführt werden, wobei nun die Befestigungspunkte J/2, 3J/2, ... , 2N/J-1 für Schleifen am Backbone hinzugefügt werden:

$$U = U_0 + U_1 + U_2 = \left(\frac{\kappa_0}{2}\right) \sum_{j=1}^{N} \left\| \vec{X}_i - \vec{X}_j \right\|^2 + \left(\frac{\kappa_1}{2}\right) \sum_{m=1}^{N/J} \left\| \vec{X}_{mJ} - \vec{X}_{(m-J)} \right\|^2 \quad \text{(II.15)}$$

$$+ \left(\frac{\kappa_2}{2}\right) \sum_{m=1}^{N/J-1} \left\| \vec{X}_{(m-1/2)J} - \vec{X}_{(m+1/2)j} \right\|^2$$

Mit denselben Argumenten, die schon oben verwendet wurden, erhält man nun für die Wahrscheinlichkeitsdichte P(r) wiederum eine Rayleigh Verteilung. Diese führt auf einen mehrere Seiten langen Ausdruck für die <r>-Abhängikeit in Bezug auf den genomischen Abstand d, weshalb hier auf die Orginalpublikation verwiesen sei [LiSa 97].
Eine nunmehr nur noch numerische Analyse ergibt folgendes Bild für die drei Parameter κ_1, κ_2 und die Loopgröße: Für genomische Abstände unterhalb von 1Mbp ergibt sich mit $\kappa_1 = 0.46$ $\langle r^2 \rangle = 0.025 + 1.88d$ in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Daten. Für große genomische Abstände ergibt sich mit einer Schleifengröße von 6Mbp ein $\langle r^2 \rangle = 2.37 + 0.08d$, wobei $\kappa^2 = 1.0$, also der schon oben erwähnte Wert. Weitere Verallgemeinerungen unter erneuter Einführung eines oder mehrerer weiterer Backbones sind somit plausibel.

II.6. Multi-Loop-Subcompartment- (MLS) Modell

Münkel entwickelte 1996 das Multi-Loop-Subkompartment-Modell, da die bisherigen Modelle die Gesamtheit der experimentellen Daten nur unzureichend beschreibt [Mü 98]. Chromatinschleifen mit einer Größe von ca. 100kbp werden zu Rosetten, den sogenannten Subkompartimenten zusammengeschlossen. Die Rosetten werden mit DNA, der sogenannten Linker-DNA, verbunden. Somit entfällt die Notwendigkeit eines Backbones (abb.II.6).
Indem man den Linker zu einer Schleife zusammenzieht oder öffnet, ergibt sich ein natürlicher Übergang von der Meta- in die Interphase. Hierzu könnte ein Protein zum Beispiel eine Verbindung zwischen den Nukleosomen herstellen. Damit ergibt sich eine einfache Kontrolle der Funktion des Genoms durch die Veränderung der dreidimensionalen Organisation.

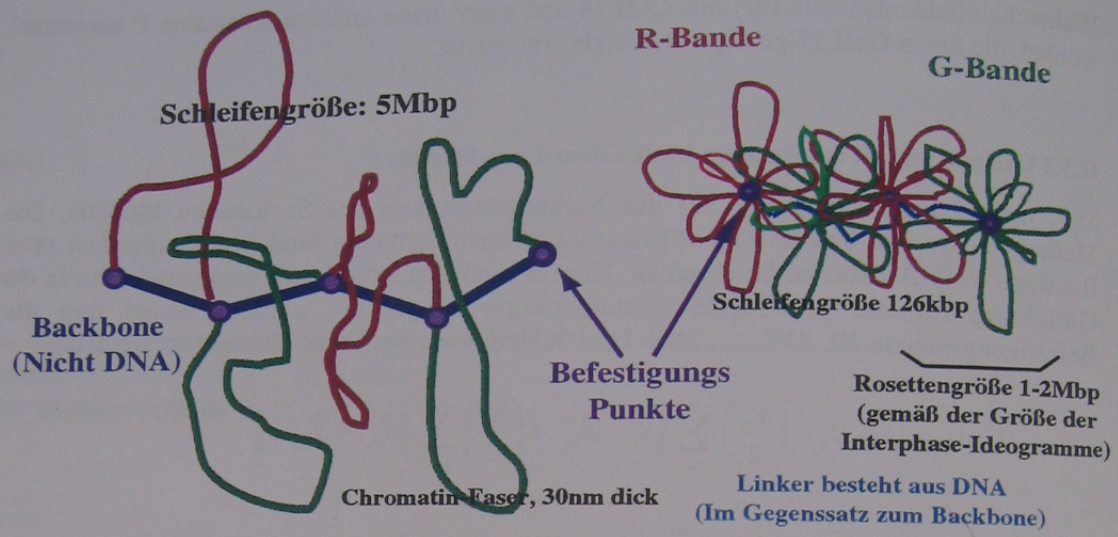


Abb.II.6:
Links:Das RWGL-Modell. Rechts: Das Multi-Loop-Subcompartment-Modell.

Die Größe der Rosetten entspricht einer Ideogrammbande in der Interphase. Die Ideogramme der Interphase unterscheiden sich von denen der Metaphase durch ihre Bandenzahl. Beim Übergang von der Metaphase in die Interphase wächst sie von 850 auf ca. 3000. Allerdings verschwindet das Bandenmuster bei üblichen Färbemethoden normalerweise in der Interphase. Kürzlich konnte jedoch [Zink, unpublished] nachweisen, daß es auch dort existiert.
Somit können Vermutungen über die Erzeugung von Bandenmustern auf organisatorische Fakten und nicht auf die Basenzusammensetzung zurückgeführt werden, wie schon lange vermutet wird [Co 78].
Darüberhinaus erklärt das MLS-Modell die gemessenen Daten Yokotas teilweise mit Präparationsartefakten. Yokotas Experimente basieren auf zwei Präparationsmethoden: hypertonisch behandelte Zellkerne wurden mit Methanol Eisessig fixiert, wogegen isotonische Zellkerne mit Paraformaldehyd fixiert wurden. Auf kleinen genomischen Abständen ergeben sich dabei für die isotonische Präparation klare Widersprüche zum RWGL-Modell(Abb.II.4). Die hypertonische Präparation läßt den Zellkern stark anschwellen, und die Fixierung mit Methanol Eisessig zerstört die Chromatinstruktur erheblich durch die radikale Beseitigung der Histone [Co 78, ReRu 77]. Es besteht somit die Vermutung, daß die das RWGL-Modell stützenden Ergebnisse als Präparationsartefakte angesehen werden können. Yokota selbst spricht bei dieser Präparation von nicht schonender Präparation.

III Simulationen

Im simulatorischen Teil dieser Arbeit wurden Chromosomenterritorien als Polymerkette verschiedenartig modelliert. Aus diesen Simulationen wurden experimentell zugängliche Observablen berechnet. Diese lieferten Aufschlüsse über die dreidimensionale Organisation von Chromosomenterritorien.
Neben räumlichen Abständen für Vergleiche mit intragenomischen Abständen wurden neue Observablen gefunden und getestet. Mit ihnen läßt sich in den Simulationen zwischen den Modellen unterscheiden. Darüberhinaus können Experimente mit den erhaltenen Vorhersagen interpretiert werden.
Im Hinblick auf zukünftige komplexere Fragestellungen der dreidimensionalen Organisation des Zellkernes erwies sich dabei eine Analyse mit Hilfe von Fraktalen als besonders lohnenswert. So konnte erstmals gezeigt werden, daß die Chromatinfaser multifraktales Verhalten aufweist.
Im folgenden wird zunächst auf die verwendeten Methoden der Modellierung eingegangen werden. Danach werden einige theoretische Aspekte der Analyse komplexer fraktaler Systeme erläutert. An die Vorstellung der Observablen, die zur Simulationsanalyse verwendet werden, schließt eine Darlegung der Simulationsdurchführung an. Schließlich werden die Simulationsergebnisse präsentiert und es erfolgt eine Zusammenfassung des simulatorischen Teils dieser Arbeit.

III.1. Simulationsmethoden

In dieser Arbeit wurden Monte-Carlo- und Brownsche Dynamik-Verfahren zur Simulation benutzt. Brownsche-Dynamik-Verfahren berechnen die Trajektorie eines Systems in Raum und Zeit unter Einfluß thermischer Fluktuationen. Daraus können dynamische Größen, wie z.B. Newtonsche Kräfte, Beschleunigungen und Geschwindigkeiten berechnet werden. Resultierende Observablen wie freie Energie oder Entropie können ebenfalls erhalten werden.
Monte-Carlo-Verfahren dagegen dienen dazu, den Phasenraum repräsentativ abzutasten, ohne zeitliche Informationen zu liefern. Große Systeme wie Chromatin oder ganze Chromosomen müssen dabei aus größeren geometrischen Untereinheiten zusammengesetzt werden, da eine Simulation auf atomarer Ebene über große Zeitskalen die Kapazitäten heutiger Rechner bei weitem übersteigt.

III.1.1: Chromatin als Polymer - Allgemeines

Die Chromatinfaser wird in dieser Arbeit vereinfacht als fadenförmiges Polymer dargestellt (Kapitel II.5). Die atomaren Details der Chromatinfaser gehen dabei in Form elastischer Eigenschaften ein.
Ein Polymer kann näherungsweise durch eine Kette aus steifen Segmenten beschrieben werden, die durch isotrop bewegliche Gelenke miteinander verbunden sind. Für die Wahrscheinlichkeit des End-zu-End-Abstandes einer solchen „Gaußschen Kette“ gilt:

$$\psi(\vec{u}) = \left(\frac{3}{2\pi b^2}\right)^{3/2} e^{-\frac{3\vec{u}^2}{2b^2}}. \qquad \text{(III.1)}$$

b ist dabei die Segmentlänge, die ein Maß für die Flexibilität der Kette darstellt: je steifer das Polymer, umso größer b.
Eine verwandte Größe ist die Persistenzlänge L_P, die die Steifigkeit einer sogenannten wurmartigen Kette beschreibt. Sie ist definiert als die mittlere Projektion des End-zu-End-Abstandes auf die Anfangsrichtung der Kette oder als Korrelation zweier Richtungsvektoren der Kette wie in [GrKh 94]:

$$\langle \vec{u}_i \vec{u}_{i+k} \rangle_i = \langle \cos(\theta(s)) \rangle \propto e^{-\frac{k}{L_P}}. \qquad \text{(III.2)}$$

III.1.2: Chromatin als Polymer - die modellierten Eigenschaften

Die Chromatinfaser wurde in dieser Arbeit als lineare Kette von Chromatinsegmenten (Abb.III.1) bei einer absoluten Temperatur von 310 K modelliert [Mü 98]. Als Segmentlänge l_0 wurde die Kuhnsche-Länge L_K gewählt, die sich für die Gaußsche Kette wie folgt ergibt:

$$\langle R^2 \rangle = \frac{L_K}{d} x. \qquad \text{(III.3)}$$

$\langle R^2 \rangle$ ist dabei der mittlere quadratische End-zu-End-Abstand einer Chromatinkette. Mit Hilfe der von van den Engh [vdE 92] bestimmten Abhängigkeit des räumlichen Abstandes vom genomischen Abstand ergibt sich mit einer Chromatindichte von d ≈ 105bp/nm, eine Kuhnsche Länge von 260 nm (Abs. II.5.2). Diese zeigt gute Übereinstimmung mit früheren Abschätzungen, die sich zwischen 200 nm und 359 nm bewegen [Os 94]. Für die Simulationen wurde ein mittlerer Wert von 300 nm gewählt, der ca. 31000bp entspricht.

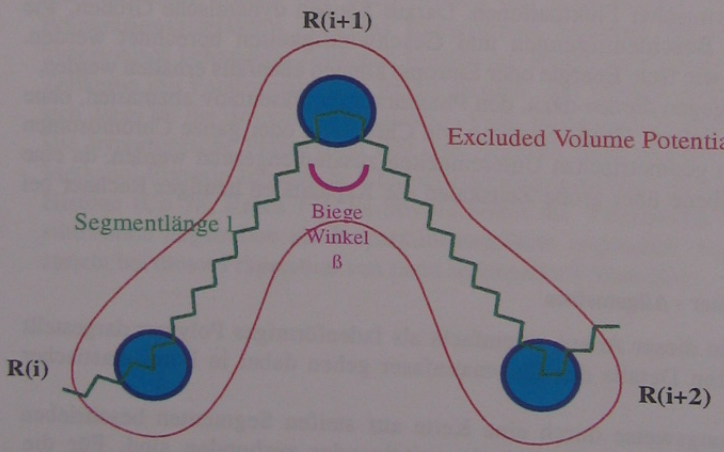


Abb.III.1:
Segmentanordnung, ihre Freiheitsgrade und Potentiale.
Zwei Segmente sind über ein Gelenk miteinander verbunden. Die Koordinaten der Gelenke werden mit R(i) beschrieben. Die Segmentlänge L ist variabel. Die rote Linie ist die Resultierende eines sphärischen Excluded Volume Potentials um die Gelenke.

Die Segmente können in ihrer Länge variieren, so daß ihnen die folgende Streckenergie zugewiesen wurde:

$$U_s(l) = \frac{k_b T}{2\delta^2}(l - l_0)^2, \qquad \text{(III.4)}$$

wobei l die aktuelle und l_0 die mittlere Länge darstellt. Da die Strecksteifigkeit für Chromatin nicht bekannt ist, wurde aus numerischen Stabilitätsgründen $\delta = 0.1$ gewählt.
Für die Biegesteifigkeit zwischen zwei benachbarten Segmenten wurde ebenfalls ein einfaches harmonisches Potential gewählt,

$$U_B(\beta) = \frac{k_b T}{2\psi^2}(\beta)^2, \qquad \text{(III.5)}$$

wobei β der Winkel zwischen diesen Segmenten ist, und ψ mit der Kuhnschen Länge gemäß

$$L_K = \frac{b_0}{2\psi^2} \qquad \text{(III.6)}$$

verknüpft ist [Mü 98].
Eine Torsionssteifigkeit wurde in der Modellierung nicht berücksichtigt, da dies eine erhebliche Reduktion der Rechenzeit erlaubt. Außerdem läßt sich diese Näherung durch die Präsenz torsionsstreß-reduzierender Proteine, wie Topoisomerase II, rechtfertigen.
Chromosomen oder Chromatinfasern durchdringen sich nicht. Um dies zu berücksichtigen, wurde eine sogenannte Excluded-Volume-Wechselwirkung (EV-WW) eingeführt:

$$U_{EV} = U_{EV}^0 k_B T\left(1 + \frac{r^4 - 2r_c^2 r^2}{r_c^4}\right), \qquad \text{(III.7)}$$

r ist dabei der Abstand zu einem Segment. In den Simulationen stellte es sich als sinnvoll heraus, r_c auf das 1.5fache der Dicke einer Chromatinfaser zu setzen. Die Höhe des zu überwindenden Potentials und damit die Wahrscheinlichkeit für das gegenseitige Durchdringen der Chromatinfasern kann durch Auswahl von U^0_{EV} variiert werden.
Die 46 Chromosomen verteilen sich auf den verfügbaren Raum im Zellkern. Für die Simulation eines einzelnen Chromosoms muß daher eine sphärische Energiebarriere U_{BOUND} eingeführt werden. Diese hat eine ähnliche Form wie U_{EV} und ist genauso hoch wie bei der EV-WW. Das Volumen ist proportional zum Verhältnis aus DNA-Gehalt des Chromosomes C_{Chrom} und dem DNA-Gehalt des gesamten humanen Genomes C_{genom}, so daß man mit dem Kernradius R_{Kern} in Übereinstimmung mit der Literatur [HH 89] den Territorienradius

$$R_{Terr} = R_{Kern}\sqrt[3]{\frac{C_{Chrom}}{C_{Genom}}}, \qquad \text{(III.8)}$$

setzt. Eine einfache Abschätzung für den End-zu-End-Abstand einer freien Chromatinkette ergibt für Chromosom 15 mit einer Länge von 106Mbp (Tab.III.1) sofort

$$\frac{b_0}{d}x \approx \sqrt{\frac{300nm}{105\frac{bp}{nm}} \times 1{,}06 \cdot 10^8 bp} \approx 17\mu m, \qquad \text{(III.9)}$$

oder für Chromosom 1 einen Wert von 27 µm. Dies überschreitet bei weitem die Größe rekonstruierter Chromosomenterritorien und selbst den Durchmesser großer Fibroblasten-Zellkerne [Ei 96]. Deshalb müssen topologische Randbedingungen gegenüber der freien Kette eingeführt werden (Kapitel II). Solche topologischen Randbedingungen erhält man z. B.durch Schleifenbildung (Abs. II.3 bis II.6). Die Basispunkte der Schleifen werden über ein Potential ähnlich dem Streckpotential aus Gl.III.4 zusammengehalten:

$$U_{Basis}(l) = \frac{k_B T}{2\delta^2} l^2. \qquad \text{(III.10)}$$

III.1.3: Brownsche-Dynamik-Algorithmen

Die Theorie der Brownschen Bewegung wurde für Systeme von Teilchen entwickelt, deren Masse und räumliche Ausdehnung um ein Vielfaches größer sind als die der Moleküle des - normalerweise fluiden - Einbettungsmediums. Diese Bedingung ist auch für Chromosomen im Zellkern erfüllt. Die Simulationen wurden gemäß dem Ermak-McCammon-Algorithmus durchgeführt [ErMc 78].
Die Langevin-Gleichungen beschreiben ein System von N Teilchen in einem solchen viskosen Einbettungsmedium. Thermische Fluktuationen des Mediums üben eine zufällige Kraft f_i auf das System aus. Dadurch tritt in der klassischen „newtonschen" Bewegungsgleichung neben der Summe F_i über die inneren und äußeren Kräfte und einem Reibungstensor für geschwindigkeitsabhängige Kräfte ζ_{ij}, noch ein Term für die zufälligen Kräfte f_i auf:

$$m_i \dot{v}_i = -\sum_j \varsigma_{ij} v_j + F_i + \sum_j \alpha_{ij} f_j, \qquad \text{(III.11)}$$

wobei m_i die Masse, v_i die Geschwindigkeit und i,j den Index der Koordinaten ($1 \le i, j \le 3N$) der Teilchen bezeichnen.
Für klassische Brownsche Systeme ist f_i gaußverteilt mit Kovarianz = 0 und Mittelwert = 0:

$$\langle f_i(t) \rangle = 0 \quad \textit{und} \quad \langle f_i(t) f_i(t') \rangle = 2D_i \delta_{ij} \delta(t - t'). \qquad \text{(III.12)}$$

D_i ist der Diffusionskoeffizient von i. Für die Koeffizienten α_{ij} gilt mit der Temperatur T und dem Boltzmannfaktor k_B der Zusammenhang

$$\varsigma_{ij} = \frac{1}{k_B T} \sum_l \alpha_{il} \alpha_{jl}, \qquad \text{(III.13)}$$

wobei ζ_{ij} proportional zum Inversen des Diffusionstensors D_{ij} ist:

$$\sum_j \varsigma_{ij} D_{jl} = \sum_j D_{ij} \varsigma_{jl} = k_B T \delta_{il}. \qquad \text{(III.14)}$$

In erster Näherung kann die Hydrodynamik einer Polymerkette durch Kugeln gleicher Größe (Radius σ und Position r) beschrieben werden, die an den Verbindungspunkten der Segmente lokalisiert sind [ChLa 94]. Der Diffusionstensor läßt sich dann als Rotne-Prager-Tensor mit der Viskosität η darstellen [RoPr 69]:

$$D_{ij} = \delta_{ij}\frac{k_bT}{6\pi\eta\sigma} - (\delta_{ij}-1)\frac{k_bT}{8\pi\eta r_{ij}^2}\left[\left(1+\frac{\vec{r}_{ij}\vec{r}_{ij}}{r_{ij}^2}\right)+\frac{2\sigma^2}{r_{ij}^2}\left(\frac{1}{3}-\frac{\vec{r}_{ij}\vec{r}_{ij}}{r_{ij}^2}\right)\right]. \qquad \text{(III.15)}$$

Nach [ErMc 78] relaxiert die Impulsverteilung viel schneller zur Gleichgewichtsverteilung als die Positionsverteilung. Für große Zeiten erhält man dann für die Zeitentwicklung der Koordinaten den Ausdruck

$$\vec{r}_i(t+\delta t) = \vec{r}_i(t) + \sum_{j=1}^{N} D_{ij}\vec{F}_j\frac{\delta t}{k_BT} + \vec{R}_i(t) \qquad \text{(III.16)}$$

und für die wiederum gaußverteilte Verschiebung $R_i(t)$ den Mittelwert und die Korrelation:

$$\left\langle \vec{R}_i(t)\right\rangle = 0 \quad \textit{und} \quad \left\langle \vec{R}_i(t)\vec{R}_i(t')\right\rangle = 2D_{ij}\delta t. \qquad \text{(III.17)}$$

Mit einer gegebenen Anfangskonfiguration läßt sich mit Gl.III.15 und Gl.III.16 eine neue Konfiguration im nächsten Zeitschritt berechnen. Die dazugehörigen Kräfte erhält man für unser Problem durch Differenzierung der entsprechenden Potentiale aus Abschnitt III.1.2.

III. 1. 4: Monte-Carlo-Algorithmen

Bei Monte-Carlo-Verfahren wird ein mathematisches Problem näherungsweise dadurch gelöst, daß man einzelne repräsentative Werte unter bestimmten Randbedingungen berechnet. Ursprünglich wurden Monte-Carlo-Verfahren am Ende des Zweiten Weltkrieges durch von Neumann, Ulam und Metropolis entwickelt [MR^2T^2 53].
Die repräsentative Auswahl wird hierbei durch eine Wahrscheinlichkeitsverteilung ρ erzeugt. Da nicht bekannt ist, wie ρ für einen gegebenen Phasenraum aussieht, muß der Phasenraum durchsucht werden.
Hierzu erzeugt man eine sogenannte Markov-Kette von Zuständen, die einer künstlichen Phasenraumtrajektorie entspricht. Um die Markov-Kette zu erhalten, muß das System von seinem Istzustand in einen neuen Zustand überführt werden.
Zwei Zustände m,n sind durch eine Übergangswahrscheinlichkeit π_{mn} verbunden, so daß aus einem Anfangszustand ρ_1 ein neuer Zustand mit $\rho_2 = \rho_1\,\pi$ ergibt. Im Limes für unendlich viele Übergänge erhält man die Eigenwertgleichung $\rho\pi = \rho$.
Man zeigen kann zeigen, daß

$$\sum_n \pi_{mn} = 1 \qquad \text{(III.18)}$$

ist. π_{mn} bezeichnet man als stochastische Matrix.
Um eine Markov-Kette und damit eine Phasenraumtrajektorie zu erzeugen, wählt man nach [MR^2T^2 53]

$$\pi_{mn} = \alpha_{mn} \qquad \rho_n \geq \rho_m \qquad \text{(II.19)}$$

$$\pi_{mn} = \alpha_{mn}\left(\frac{\rho_n}{\rho_m}\right) \qquad \rho_n < \rho_m$$

für $m \neq n$ und α als eine symmetrische stochastische Matrix.

Um von einem Zustand in den nächsten zu gelangen, führt man das System mit einer zufälligen Verschiebung, einem sogenannten Monte-Carlo-Schritt, in einen anderen Zustand über. Daraus resultiert eine Energieänderung δV_{mn}. Um das Verhältnis ρ_n/ρ_m und damit die Übergangswahrscheinlichkeit zu bestimmen, bildet man den Boltzmannfaktor der Energiedifferenz [AlTi 87]:

$$\frac{\rho_n}{\rho_m} = \frac{e^{(-\beta V_n)} e^{(-\beta \delta V_m)}}{e^{(-\beta V_n)}} = e^{(-\beta \delta V_{nm})}. \qquad \text{(II.20)}$$

Ist $\delta V_{mn} < 0$, so wird der Monte-Carlo-Schritt immer akzeptiert, ist dagegen $\delta V_{mn} > 0$, so wird die Veränderung jedoch nur mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit akzeptiert.
Die Kunst der Metropolis-Monte-Carlo-Methode besteht darin, die Schritte für ein System so zu wählen, daß die Akzeptanzrate möglichst hoch ist, um den Phasenraum möglichst schnell abzutasten.
Um die Chromatinfaser zu modellieren, wurden nun folgende Schritte verwendet:

1) Zwei Segmente werden um einen zufälligen Winkel um die Verbindungslinie des Anfangs des einen und des Endes des anderen Segmentes gedreht.
2) Die Chromatinschleifen (Abs.II.5 und II.6) werden um einen zufälligen Winkel um ihre Basis verdreht. Da die Segmente dabei auseinanderdriften können (siehe Basispotential Abs.III.1.2), muß ein Relaxationschritt eingeführt werden (siehe 4)).
3) Ein ganzer Teil der Kette wird um die Verbindungslinie seiner Enden gedreht. Dies bezeichnet man als Pivot-Schritt.
4) Um die Energie zu minimieren, ist ein sogenannter Relaxierungsschritt notwendig. Er besteht aus einem Brownschen-Dynamik-Schritt ohne Zufallskräfte.

Nachdem ein Schritt durchgeführt wurde, wird mit Hilfe der Potentiale aus Abschnitt III.1.2 die Energie, die Energiedifferenz δV_{mn} und die Akzeptanz dieser neuen Trajektorie bestimmt. Die Schrittgröße wurde so gewählt, daß die Akzeptanzrate bei 50±5% liegt. Wird die Akzeptanzrate unterschritten, so werden die Schrittgrößen verkleinert, und umgekehrt.

III.2: Fraktale Analyseverfahren komplexer Systeme

III.2.1: Einführung

Die Theorie der Fraktale wurde von Benoit Mandelbrot in den 70er und 80er Jahren zur Beschreibung komplexer Systeme entwickelt [Man83]. Fraktale sind selbstähnliche[1] oder selbstaffine[2], skaleninvariante Objekte, die sowohl als reguläre Fraktale (exakte Selbstähnlichkeit), als auch als Zufalls- oder Brown-Fraktale (statistische Selbstähnlichkeit) auftreten können.
Ein Beispiel für ein Fraktal stellt eine Küstenlinie dar, die immer prinzipiell ähnlich aussieht, wenn man sie aus verschiedener Höhe, also mit verschiedener Auflösung, betrachtet. Für die Länge der Küstenlinie als Funktion der Auflösung ergibt sich dabei ein Skalengesetz.
Für die Unterscheidung verschiedener Strukturen erhält dabei man sofort ein Maß in Form des Exponenten des Skalengesetzes. Weiterhin erhält man die Möglichkeit, verschiedene Klassen von Skalengesetzen miteinander zu vergleichen.
Insbesonders gelten solche Skalengesetze auch für die räumliche Anordung von Objekten und die in einer solchen Anordnung ablaufenden dynamischen Prozesse. Die Theorie der Fraktale stellt hierdurch ein Maß für die Irregularität und die Raumerfüllung eines Systems dar (Abb.III.2). Die Irregularität der Küstenlinie läßt sich mit der fraktalen Dimension D (dem Exponenten eines Skalengesetzes) charakterisieren.
Für die Länge der Küstenlinie mit verschieden großen Maßstäben (Auflösung) erhält man

$$N(\lambda) \propto \lambda^{-D} \qquad bzw. \qquad L(\lambda) = N(\lambda) \cdot \lambda \propto \lambda^{1-D}. \qquad \text{(III.21)}$$

$N(\lambda)$ ist dabei die Zahl der Maßstäbe der Länge λ, mit der die Länge L der Kurve bestimmt

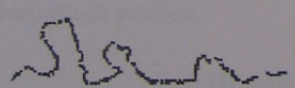
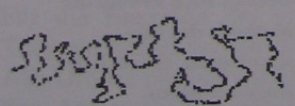
	Topologische Dimension	Fraktale Dimension
	1	1,00
	1	1.02
	1	1,25
	1	1,45

Abb.III.2:
Hier wird gezeigt, wie sich die fraktale Dimension einer Kurve bei immer stärkerer Faltung verändert, bzw. den hier zweidimensionalen Raum der Fläche immer mehr ausfüllt. [Ka 89]

[1] Selbstähnliche Objekte = Vereinigungsmenge isotrop-reskalierter Kopien ihrer selbst.

wird. Die Maßstäbe sind dabei starr und werden, von einem Punkt der Kurve ausgehend, zum nächsten in gerader Linie gemessen.
Der Zusammenhang mit der klassischen Definition der Dimension ergibt sich aus der Beziehung zwischen topologischer Dimension D_{top}, Hausdorff-Dimension D_{Haus} und euklidischer Dimension E:

$$D_{top} < D_{Haus} = D < E. \qquad \text{(III.22)}$$

Mit der so erzeugten fraktalen Dimension können nun Aussagen über die Entstehung des untersuchten Systems oder die Prozessdynamik, insbesondere aber Diffusionseigenschaften gemacht werden.

III.2.2: Das Stechzirkel und Box-Verfahren

Die fraktale Dimension einer Kurve wird aus den verschiedenen Kurvenlängen L in Abhängigkeit von der Länge der Maßstäbe bestimmt. Hierzu wird im allgemeinen die Stechzirkelmethode verwendet (Abb.II.3):
Mit einer Zirkelspanne einer bestimmten Größe beginnt man an einem beliebigen Einstichspunkt und sucht den Schnittpunkt des Zirkelkreises mit der Kurve. Dieser gilt als nächster Einstichspunkt. Der Zirkel wird entweder von außen oder von innen an die Kurve herangeführt, da in realen Datensätzen die genauen Kurvenkoordinaten meist unbekannt sind.
Fehler bei der Vernachlässigung von Einbuchtungen können durch Mittelwertbildung über verschiedene Anfangspunkte verkleinert, aber nicht beliebig minimiert werden. Dieses Verfahren wiederholt man für verschiedene Zirkelspannen, um Gl.III.21 anwenden zu können.
Mit dem Box-Verfahren bestimmt man die fraktale Dimension einer Massenverteilung. Der Raum wird dabei mit Würfeln einer Kantenlänge überdeckt und das vom Objekt belegte Volumen bestimmt. Variation der Kantenlänge führt ähnlich zu Gl.III.21 auf

$$N_{box}(\lambda) \propto \lambda^{-D} \qquad bzw. \qquad V_{box}(\lambda) = N(\lambda) \cdot \lambda^3 \propto \lambda^{3-D} \qquad \text{(III.26)}$$

und somit die fraktale Dimension. Da das Verfahren allgemein für beliebige Euklidische Dimensionen gilt, kann auch die fraktale Dimension einer Kurve bestimmt werden..

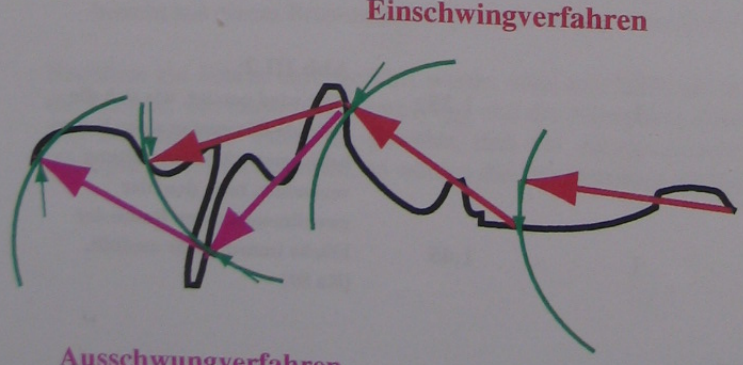


Abb.III.3:
Das Stechzirkelverfahren: Gezeigt wird sowohl die Methode des Einschwingens, als auch des Ausschwingens. Einbuchtungen der Kurve können leicht vernachlässigt werden.

III.3. Observablen der Simulationsanalyse

Für die Analyse der Simulationen wurden Größen berechnet, die es zuließen, zwischen den simulierten Modellen der Chromosomenorganisation zu unterscheiden. Die Observablen dienen zur Interpretation und zur Vorhersage von experimentellen Daten. Dies gilt insbesondere für intragenomische Abstände. Neben diesen wurden weitere Observable gefunden und getestet, die Aufschlüsse über die dreidimensionale Organisation von Chromosomenterritorien liefern.
In den folgenden Abschnitten werden die verwendeten Observablen kurz erläutert. Zuvor soll aber noch auf das geschriebene Analyseprogramm Geometry eingegangen und allgemeine Aussagen über die Observablen gemacht werden:

Analyseprogramm Geometry:
Für die Analyse der Simulationen wurde ein Programm namens „Geometry", das die Observablen berechnet, in der objektorientierten Programmiersprache C++ entwickelt.
Objektorientiert bedeutet, daß das Programm in separierten Einheiten, den sogenannten Objekten, organisiert ist. Die einzelnen Objekte können dabei mit anderen Objekten nur über genau definierte Schnittstellen in Verbindung treten. Die detaillierten Vorgänge innerhalb eines Objektes sind somit für andere Objekte irrelevant. Objektorientierte Programmierung bot die Möglichkeit, Änderungen schnell und effizient zu implementieren, da diese nur in den einzelnen Objekten vorgenommen werden müssen. Änderungen im gesamten Programmablauf wurden dabei selten nötig.

Einordnung der Observablen in einzelne Klassen:
Die verwendeten Observablen lassen sich generell in solche mit globaler, halb-globaler und lokaler Aussagekraft trennen:

- Globale Observablen machen eine Aussage über das Gesamtsystem, wobei über die gesamte lokale Struktur des Systems gemittelt wird.
- Halb-globale Observable mitteln über Teilbereiche des gesamten Systems. Sie machen somit Aussagen über lokale Strukturen, betrachten aber deren Verhalten im gesamten System.
- Lokale Observable machen dagegen eine Aussage über eine genau spezifizierte lokale Struktur eines Systems.

Lokale und halb-globale Observable können dabei durch globale Eigenschaften des Systems beeinflußt werden.

III.3.1 Energien, Geometriedaten und Segmentlänge (global)

Für die Energien der einzelnen Potentiale, den Gyrationsradius, die Eigenwerte des Trägheitstensors und die Segmentlänge wurden die Häufigkeitsverteilungen bestimmt.
Alle Größen machen dabei eine Aussage über das Relaxierungsverhalten einer Simulation von der Anfangskonfiguration ins Gleichgewicht. Ist die Standardabweichung der Segmentlängenverteilung zum Beispiel klein, so ist die Simulation gut relaxiert und umgekehrt.Der Gyrationsradius und die Eigenwerte stellen darüberhinaus noch ein gutes Maß für die Ausdehnung eines Chromosoms dar.

Da die Häufigkeitsverteilungen schnell zu berechnen sind, dienten sie zur Online-Überwachung der Simulationen.

III.3.2 Radiale Aufenthaltswahrscheinlichkeit und Dichte (global)

Die radiale Aufenthaltswahrscheinlichkeit wurde als die Häufigkeitsverteilung der Masse in Abhängigkeit des radialen Abstandes zum Massenschwerpunkt berechnet. Die radiale Dichte ist die, auf das Volumen einer Kugelschale normierte, Aufenthalts-wahrscheinlichkeit in einem bestimmten radialen Abstand zum Massenschwerpunkt. Die Breite der Kugelschale wurde durch die Auflösung der Häufigkeitsverteilung vorgegeben.
Für die dreidimensionale Organisation von Chromosomen spielt die Massenverteilung eine wesentliche Rolle. Sowohl bevorzugte Regionen, als auch ihr Randverhalten können bestimmt werden. Eine schnell abfallende Dichte spricht bei Chromosomen für eine geschlossene Struktur mit geringer Wechselwirkungsfläche. Diese Angabe ist jedoch relativ zur maximalen Dichte und macht eine Aussage über die „Rauhigkeit" der Chromosomenoberfläche.

III.3.3 Räumliche Abstände

FromBegin - Abstand zu einem festen Punkt (global):
Der FromBegin-Abstand bestimmt die räumliche Distanz als Funktion des genomischen Abstands, bezogen auf ein Ende der Chromatinfaser des Chromosomes. Dabei läuft man durch die Chromatinkette und bestimmt den Abstand zum Ende des p-Armes des Chromosoms.Der FromBegin-Abstand macht damit eine Aussage über die globale Faltung der Chromatinfaser bezüglich eines festen Referenzpunktes.

All Pairs und Random Pairs (halbglobal):
Im Gegensatz zu FromBegin wurden auch die räumlichen Abstände aller Chromatinsegmente (All Pairs) zueinander als Funktion des genomischen Abstands, bestimmt. In einem System endlicher Größe, wie es hier vorlag, ist dabei die Anzahl der paarweisen genomischen Abstände antiproportional zu den genomischen Abständen selbst. Da die Abstände nicht mehr bezüglich eines festen Referenzpunktes bestimmt werden, ergibt sich eine Mittelung über verschiedene räumliche Strukturen mit gleichem DNA-Gehalt.
Damit ergibt sich eine Abstandsverteilung, die einem variablen Schleifenbasispunkt im MLS-Modell entspricht. Ein Markerpaar mit einem gegebenen genomischen Abstand würde relativ zu diesem Basispunkt also beliebig lokalisiert sein.Dies führte zwar zu Aussagen über die Verteilung der Schleifengrößen, Rosettengrößen und Schleifenanzahl, aber nicht zu spezifischen Aussagen für ein Markerpaar.

III.3.4 Räumliche Abstände zwischen genomischen Markern (lokal)

Räumliche Abstände zwischen Markerpaaren eines genomischen Abstands können bezüglich eines festen Referenzpunktes bestimmt werden. Man wählt dabei eine genomische Distanz und wählt den Referenzpunkt auf der Chromatinfaser aus, an der einer der beiden Marker lokalisiert ist. Die resultierende Abstandsverteilung kann im Vergleich mit dem Experiment über die Art der Basispunkte eine Aussage machen. Insbesondere läßt sich feststellen, ob die Schleifen-basispunkte fest sind oder nicht.
Da nicht bekannt ist, wo ein reales Markerpaar lokalisiert ist, müssen räumliche Abstände zwischen verschobenen Anfangspunkten separat bestimmt werden. Es wurde festgestellt, daß

mindestens ein Markerensemble mit vier Markern nötig ist, um eine zuverlässige Aussage für die genaue Lokalisation von Markern zu treffen.Wird ein solches Markerensemble durch eine MLS-Rosette geschoben, so erhält man eine Menge verschiedener räumlicher Abstände, die räumliche Periodizitäten aufweist. Die Abstandsverteilung variiert ebenfalls je nach Position des Markerensembles, da die Schleifen sich auch in der Zeit bewegen.

III.3.5 Aufenthaltswahrscheinlichkeit von genomischen Markern (global)

Analog zu Abschnitt III.3.2 kann auch die radiale Markeraufenthaltswahrscheinlichkeit und die radiale Markerdichte bestimmt werden. Dies führt zu Aussagen über dynamische Prozesse, wie zum Beispiel Umlagerungen bestimmter Substrukturen an die Oberfläche eines Chromosomenterritoriums. Eine nichtlokale Markeraufenthaltswahrscheinlichkeit deutet dabei auf eine variable und dynamische Organisation hin und umgekehrt.
Im Vergleich mit Experimenten könnte somit eine Entscheidung über die Validität eines Modells bezüglich zusätzlicher topologischer Einschränkungen (Kernmatrix) getroffen werden.Ebenfalls wird eine Abschätzung möglich, inwieweit Abstandsmessungen von Markern, relativ zur Chromosomenoberfläche, mit realistischen Modellen beschreibar sind.

III.3.6 Fraktale Dimension (komplex [global, halb-global, lokal])

In der Strukturbiologie wurden bisher fraktale Analysen nur bei Proteinen eingesetzt, um deren Peptid-Rückgrat und Oberflächenrauhigkeiten zu bestimmen. Als erster Ansatz wurde zunächst ein exaktes Stechzirkelverfahren entwickelt (Abb.III.4). Dieses Verfahren berechnet die fraktale Dimension der Chromatinfaser.
Von einem zufällig ausgewählten Segment wird die Kurvenlänge der Chromatinfaser mit verschiedenen Maßlängen zu beiden Enden der Chromatinfaser hin bestimmt. Der Schnittpunkt mit der Chromatinfaser für das exakte Stechzirkelverfahren ergibt sich in zwei Schritten: Zunächst wird der Abstand zwischen jetzigem Einstichspunkt und nächstem Segmentanfang bestimmt. Ist dieser kleiner als das gewählte Maß, wird dies für den folgenden Segmentanfang wiederholt, bis der Abstand größer wird als die Maßlänge. Im dem Segment, in welchem die Maßlänge überschritten wird, muß also der nächste Einstichpunkt liegen.

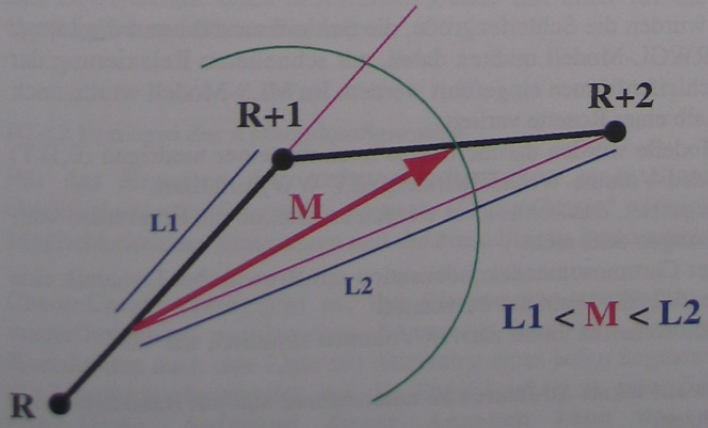


Abb.III.4:
Exaktes Stechzirkelverfahren. Zunächst wird untersucht, in welchem Segment der nächste Einstichpunkt des Zirkels der Länge M liegt (L1 < M < L2). Dann wird aus den Vektoren von R nach R+1 und R+1 nach R+2 und der Länge M der neue Einstichpunkt exakt berechnet.

Mit den Koordinaten des Segmentanfangs und des Zirkeleinstichpunktes läßt sich dann algebraisch der neue Zirkeleinstichspunkt exakt berechnen (Abb.II.4).
Für kleine Maße bestimmte das Verfahren die Kurvenlänge sehr gut. Für große Maße mußte jedoch eine Mittelung über mehrere Anfangspunkte erfolgen, da hier die spezifische Struktur des Objektes eingeht. Die Zahl der Mittelungen wurde bei verschieden großen Maßen so gewählt, daß die Standardabweichung über den ganzen Maßbereich vernachlässigbar wurde, Folgende Mittelungen wurden vorgenommen:

$$\begin{aligned} 0\text{nm} < \text{Maß} < 50\text{nm} &\Rightarrow 1 \text{ Anfangspunkt} \\ 50\text{nm} \leq \text{Maß} < 100\text{nm} &\Rightarrow 2 \text{ Anfangspunkte} \\ 100\text{nm} \leq \text{Maß} < 500\text{nm} &\Rightarrow 4 \text{ Anfangspunkte} \\ 500\text{nm} \leq \text{Maß} < 1000\text{nm} &\Rightarrow 6 \text{ Anfangspunkte} \\ 1000\text{nm} \leq \text{Maß} < L_{\text{Cut-Off}} &\Rightarrow 8 \text{ Anfangspunkte} \end{aligned}$$

Als Anfangsmaß wählt man normalerweise ein Länge von ungefähr 10% der kleinsten strukturaufbauenden Einheit. Im allgemeinen mißt man dabei also die fraktale Dimension eines euklidischen Objektes aus. Überschreitet das Maß eine gewisse Länge, so gelangt man zu einem Endlichkeits-Cut-Off, da reale Objekte räumlich limitiert sind. Maße, die mehr als 70% bis 80% der Gesamtausdehnung eines Objektes ausmachen, sind für die Bestimmung der fraktalen Dimension deshalb nicht mehr sinnvoll [Ka 89].

III.4. Simulationsdurchführung

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Modelle der dreidimensionalen Organisation von Chromosomenterritorien simuliert, um zwischen den Modellen zu unterscheiden und um Vorhersagen für experimentell meßbare Größen zu machen. Vor allem wurden dabei Kriterien für die Unterscheidung von RWGL- und MLS-Modell entwickelt.
Um die Modelle in ihrer Gesamtheit zu untersuchen und realistische Aussagen über experimentelle Daten zu erhalten, mußten bei den Simulationen verschiedene Parameter variiert werden. Vor allem das Ziel, Aussagen für zukünftige komplexere Fragestellungen der Organisation im Zellkern zu gewinnen, beieinflußte dabei den Simulationsansatz, bzw. führte zu bestimmten Randbedingungen:

Im RWGL- und MLS-Modell wurden die Schleifengröße, die Schleifenanzahl und die Länge der Linker-DNA variiert. Im RWGL-Modell mußten dabei, zur schnelleren Relaxierung der großen Schleifen, besondere Schleifenformen eingeführt werden. Im MLS-Modell wurde noch die Schleifenanordnung innerhalb einer Rosette variiert.
Die sich daraus ergebenden Modelle wurden darüberhinaus noch mit einer niedrigen (0,1kT) und einer hohen (1,0kT) Excluded-Volume-Wechselwirkung (EV-WW) simuliert.
Die Simulationen wurden so angesetzt, daß kontrolliert werden konnte, ob die Ergebnisse vom gewählten Anfangszustand abhängen oder nicht.
Vorhandene Effekte, die bei der Chromosomendekondensation mit Brownscher Dynamik eine Rolle spielen, beeinflußten ebenfalls die Wahl der Parameter.
Weiterhin wurden ganze Chromosomen in ihrem nativen Volumen simuliert, um

- den Einfluß von globalen auf lokale Strukturen zu untersuchen, und um Randeffekte zu vermeiden und abzuschätzen.

- im RWGL-Modell Effekte einer realistischen Schleifenwechselwirkung im Hinblick auf sterische Behinderungen zu untersuchen.
- für die Simulation ganzer Zellkerne hinreichend detailliertes Datenmaterial zu erzeugen, da für ganze Kerne in absehbarer Zeit keine vergleichbare statistische Aussagekraft zu gewinnen ist. Dabei zeigt sich auch, ob es genügt, einzelne Chromosomen außerhalb des Kernverbandes zu simulieren.
- aufgrund der unterschiedlichen Ideogrammbandengrößen im MLS-Modell Aussagen über Rosetten mit verschiedener Schleifenzahl zu treffen. Damit können dann lokale Aussagen für vergleichbare Ideogrammbanden anderer Chromosomen, ohne erneute Simulation, gemacht werden.

Im weiteren wird nun die Simulationsdurchführung für Chromosom 15 genauer besprochen. Chromosom 15 wurde gewählt, um den Vergleich mit dem experimentellen Teil dieser Arbeit so genau wie möglich durchführen zu können.

III.4.1 Ideogramme

Da eine Rosette im MLS-Modell einer Ideogrammbande entspricht und deren DNA-Gehalt besitzen sollte, mußte eine zuverlässige Liste für die genomische Größe der 850 ISCN(1985) Metaphasebanden [ISCN 85] erstellt werden (Abb.III.5). Hierzu wurden die hochauflösenden Daten über Chromosomenideogramme von Uta Francke [Fr 94] verwendet. Die mit verschiedenen Färbetechniken erstellten Human-Ideogramme stellen bisher die genaueste Bandenlokalisation dar (Fehler < 4%). Zunächst wurden die gesamten Daten digitalisiert und die nichtenthaltenen Zentromergrößen mit einem Lineal aus den maßstabsgetreuen Abbildungen bestimmt. Die von U. Francke und anderen vermerkte unterschiedliche Schattierung der Banden wurde nicht berücksichtigt, da bis heute nicht bekannt ist, was hierfür den eigentlichen Grund darstellt (Konformationsänderung, andere Basenkonzentration, Proteinbesatz oder eine Mischung aus allem [Co 78]). Unter der Hypothese, daß jede Interphasenbande einer Rosette entspricht, wurde es notwendig, die heteromorphen Regionen 1q12 und 9q12 zu halbieren, sowie Yq12 zu dritteln, da ihr DNA-Gehalt bezüglich dem durchschnittlicher Banden zu hoch war. In den Testsimulationen hatte dies zu irreal hohen Schleifenzahlen und Chromatindichten geführt. Mit Hilfe von Tabelle II.1 wurde es möglich, den DNA-Gehalt einer bestimmten Bande mit einer für die Modellierung ausreichenden Genauigkeit von 5% zu bestimmen.

III.4.2 Erzeugen der Anfangskonfiguration

Für das Erstellen der Anfangskonfiguration einer Simulation wurde ein weiteres objektorientiertes Programm namens „ChromCreate“ entwickelt. Im folgenden sollen die Möglichkeiten des Programms und die einstellbaren Parameter kurz erläutert werden.

ChromCreate ermöglicht es, die Chromatinsegmente im Raum gemäß den Modellvorstellungen zu positionieren. Es erzeugt dabei eine Konfigurationsdatei, die neben den Koordinaten auch eine Liste mit Attributen eines jeden Segments enthält. Die Attribute geben die Länge des Segmentes und die Zugehörigkeit zu einer Schleife oder einem Linker an (Abb.III.6). Aufgrund dieser Angaben kann das von Münkel entwickelte

Simulationsprogramm entscheiden, welche Monte-Carlo oder Brownsche-Dynamik Schritte durchgeführt werden.
Mit ChromCreate kann jedes gewünschte Chromosom oder Subkompartiment simuliert werden. Die Kenndaten des jeweiligen Chromosoms werden aus den digitalisierten Ideogrammdaten bestimmt. Somit ist es auch möglich, nur einige Ideogrammbanden zu simulieren.
ChromCreate wurde weiterhin so gestaltet, daß mit den unten angegebenen Parametern völlig beliebige Anordnungen von Schleifen und Linkern erzeugt werden können.

Länge der Segmente:
Die Segmentlänge bedingt den Grad der Diskretisierung des Modells und damit seine Auflösung. Die Länge der Chromatinsegmente (in Nanometern) kann frei gewählt werden. Ihr Basenpaargehalt wird dabei automatisch bestimmt. Für Segmente, die sich im Linker befinden, und für Segmente, die sich in einer Schleife befinden, können unterschiedliche Werte benutzt werden, so daß eine Feinabstimmung der Modelle erfolgen kann.

Dicke der Chromatinfaser:
Die Dicke der Chromatinfaser und damit die Wechselwirkung bei einer Annäherung zweier Segmente kann eingestellt werden. Für Monte-Carlo-Simulationen hat sich ein Wert von 60nm, für Brownsche-Dynamik-Simulationen von 30nm (30nm-Faser) bewährt.

Schleifengröße:
Die Schleifengröße wird normalerweise in Basenpaaren angegeben. Im MLS-Modell wird mit Hilfe des DNA-Gehalts der jeweiligen Ideogrammbande aus der Schleifengröße die Anzahl der Schleifen bestimmt. Zur Vermeidung von Rundungsfehlern sollte der Basenpaargehalt einer Schleife ein Vielfaches des Basenpaargehaltes eines Segmentes sein.

Schleifenanordnung:
Zwei Möglichkeiten verschiedener Schleifenanordnung wurden implementiert:
Bei der „cis“ Anordnung werden Schleifen drehsymmetrisch zu einer Rosette zusammengelagert. Dies entspricht dem Modell von Pienta und Coffey.
Bei der „trans“ Variante werden zwei Schleifen gegenüber und die weiteren, der Form einer Acht folgend, zwischen diese gesetzt.

Schleifenform:
Neben der normalen Schleifenform gibt es noch zwei weitere:
Die Segmente einer sogenannten 2D-Schleife folgen einem Random-Walk in der Ebene. Bei 3D-Schleifen folgen sie einem Random-Walk im dreidimensionalen Raum. Ab einem DNA-Gehalt von ca. 1Mbp relaxieren 2D- und 3D-Schleifen schneller ins Gleichgewicht, als normale Schleifen.

Abb.III.5:
Ideogramm-Darstellung des humanen Genomes wie es verwendet wurde um das MLS-Modell zu eichen [VoVo 95].

Chromosom	Gesamtlänge [Mbp]	p - Arm Länge [Mbp]	q - Arm Länge [Mbp]	Armverhältnis p / q
1	263	128	135	0,948
2	255	99	156	0,635
3	214	99	115	0,861
4	203	56	147	0,381
5	194	52	142	0,366
6	183	65	118	0,551
7	171	65	106	0,613
8	155	50	105	0,476
9	145	51	94	0,543
10	144	44	100	0,440
11	144	58	86	0,674
12	143	39	104	0,375
13	114	16	98	0,163
14	109	16	93	0,172
15	106	17	89	0,191
16	98	39	59	0,661
17	92	28	64	0,438
18	85	20	65	0,308
19	67	30	37	0,811
20	72	31	41	0,756
21	50	11	39	0,282
22	56	13	43	0,302
X	164	62	102	0,608
Y	59	13	46	0,283

Tab.III.1:
Daten zum humanen Genom: Länge der Chromosomen, deren Arme und das Armverhältnis.

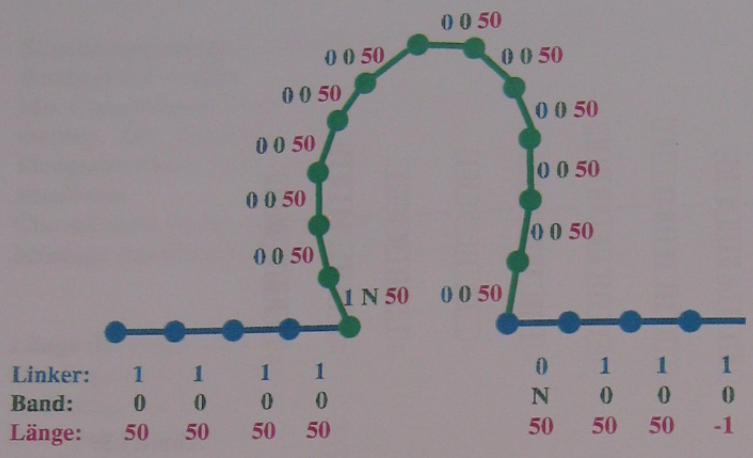


Abb.II.6:
Attribute eines Segmentes je nach seiner Position:
Generell kennt jedes Segment seine Länge. Linker besitzen den Linkerwert 1 und den Bandenwert 0. Segmente einer Schleife besitzen für beides eine 0, das erste Segment einer Schleife bestitzt 1N (N = Schleifennummer), das letzte 0N. Das allerletzte Segment eines Chromsomes besitzt eine Länge von -1.

Länge des Linkers:
Der Linker verbindet im MLS-Modell die Rosetten und im RWGL-Modell einzelne Schleifen miteinander. Die Linkerlänge kann in Segmenten oder prozentual zur Ideogrammbandengröße gewählt werden. Beim MLS-Modell wird der benötigte DNA-Gehalt aus der Ideogrammbande abgezweigt. Im RWGL-Modell dagegen verringert sich die Schleifenzahl eines ganzen Chromosoms.

Form des Linkers:
Die Form des Linkers entscheidet über die Ausdehnung und das Erscheinungsbild der Anfangskonfiguration. Im MLS-Modell bildet der Linker eine ebene Schleife zwischen den Rosetten. Diese Struktur entspricht in Form und Ausdehnung einem Metaphasechromosom.
Die 2D- und 3D-Schleifenform dagegen macht es bei hoher EV-WW notwendig, den Linker als lineare Kette oder 3D-Random-Walk zu wählen, damit die Schleifen sich nicht durchdringen.

Implementierte Modelle:
Neben dem MLS- und dem RWGL-Modell sind hier noch zwei weitere Modelle, die im weiteren als TAK-Modelle bezeichnet werden, implementiert: sie stellen RWGL-Modelle dar, bei denen die Schleifengröße variiert und dem 850- bzw 2550-Bandenmuster angepaßt wird. Man nimmt dabei an, daß die kleinen Schleifen einer Rosette durch Präparationsartefakte in eine große Schleife übergehen.

III.4.3 Simulationsansatz des MLS-Modells

Zu Beginn dieser Arbeit war durch erste Simulationen von C. Münkel bekannt, daß ein MLS-Model von Chromosom 4 mit einer Schleifen- und Linkergröße von ca. 100kbp und ca. 10 bis 20 Schleifen pro Subkompartiment die Daten von Yokota erklären konnte.

Für die Simulation des MLS-Modells wurde die Linkerlänge, die Schleifengröße, die Schleifenanordnung, die DNA-Gehalt des gesamten Chromosoms und die Excluded Volume Wechselwirkung variiert.

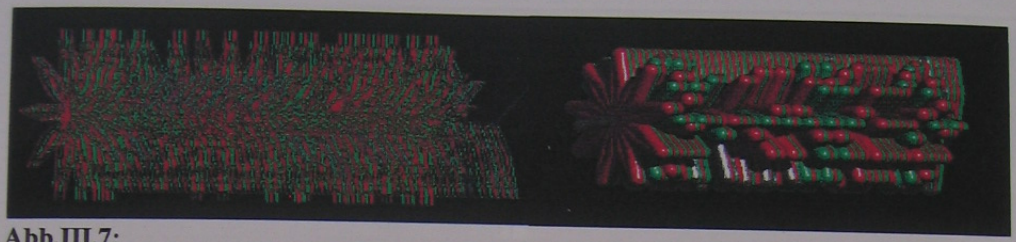


Abb.III.7:
Wire Frame Bild und Ray Traced Bild der Anfangskonfiguration von eines MLS-Modells. In rot und grün sind abwechselnd die Rosetten angefärbt. Schleifengröße 126kbp, Linkerlänge 1200nm.

Für eine sinnvolle Simulation wurden zwei Felder mit 16 beziehungsweise 6 Parametern angesetzt.

Feld 1:
Die Linkerlänge wurde mit 600nm, 1200nm, 1800nm und 2400nm variiert. Für jede Linkerlänge wurden sodann die Schleifen in cis- und trans-Stellung angeordnet. Jede der acht Kombinationen wurde mit niedriger (0,1kT) und hoher (1,0 kT) EV-WW simuliert. Die Schleifenlänge betrug 126kbp, mit der in Testsimulationen gute Ergebnisse erzielt worden war. Für die Form der Schleifen und des Linkers wurden nur normale Schleifen verwendet. Die 16 sich ergebenden Simulationen sind im Anhang im Detail zusammengestellt (Tab.A.1).

Feld 2:
Für die Schleifengröße wurde 80kbp, 100kbp, 158kbp und 251kbp gewählt. Die Schleifengröße von 126kbp kann aus Feld 1 entnommen werden. Schließlich wurde noch die Chromosomengröße von 82Mbp, 90Mbp, über 106Mbp nach 95Mbp variiert, wobei der relative Volumenanteil des Chromosoms am Kern beibehalten wurde. Es wurde eine trans-Anordnung der Schleifen, eine Linkerlänge von 1200nm, normale Schleifenform und Linkerform, sowie eine niedrige EV-WW angenommen. Die 6 sich ergebenden Simulationen sind im Anhang im Detail zusammengestellt (Tab.A.2).

III.4.4 Simulationsansatz des RWGL-Modells

Für die Simulation des RWGL-Modells wurde die Schleifengröße, die Linkerlänge, die Schleife- und Linkerform und die Excluded Volume Wechselwirkung variiert.
Als Schleifenlänge wurden die folgenden Werte verwendet: 5Mbp, 4Mbp, 3Mbp, 2Mbp, 1Mbp, 0.5Mbp, 0.25Mbp und 125Mbp. Dadurch wurde für große Schleifen eine ausreichende Zahl von Möglichkeiten für den Vergleich mit Experimenten und für kleine Schleifen ein Anschluß an das MLS-Modell gewährleistet.
Die verschiedenen Schleifengrößen wurden mit niedriger und hoher EV-WW simuliert. Da das RWGL-Modell eine andere dreidimensionale Organisation zeigt, konnten Ergebnisse aus Simulationen des MLS-Modells nicht ohne weiteres übernommen werden. Während nun für die Schleifengrößen 5Mbp, 4Mbp, 3Mbp und 2Mbp bei hoher EV-WW stets eine 2D-Schleife verwendet wurde, wurde bei niedriger Wechselwirkung stets eine 3D-Schleifenform verwendet. Die Schleifen wurden durch einen Randomlinker verknüpft.

Schleifenlänge [Mbp]	Schleifen länge in ganzen Segmente [Mbp]	Schleifenanzahl N_{LA}	$b_L = \sqrt{\frac{R^2}{N_{LA}}}$ [nm]	$R \equiv b_L \Rightarrow N_{LS} = \frac{R^2}{b_{SL}^2}$	Linkerlänge N_{LS} [n*300nm]	Schleifenanzahl Create [N_{LSreal}]	b_{real} [nm]	N_{real}	Reale Linkerlänge [N_{real}* 300nm]
5.0	5.026908	21.08	1045.46	12.14	12	19	1101.19	13.47	14 ⇒ 12
4.0	4.021527	26.36	934.91	9.71	10	25	960.00	10.24	10 ⇒ 10
3.0	3.016145	35.14	809.73	7.29	8	33	835.57	7.76	8 ⇒ 8
2.0	2.010763	52.72	661.08	4.86	(6)	48	669.82	5.33	5 ⇒ (6)
1.0	1.005381	105.43	467.48	2.43	2	94	495.08	2.72	3 ⇒ 4
0.5	0.502690	210.87	330.54	1.21	(2)	187	351.01	1.37	1 ⇒ 2
0.25	0.251345	421.73	233.74	0.61	(2)	333	263.04	0.77	1 ⇒ (2)
0.125	0.125672	843.46	165.28	0.30	(2)	561	202.66	0.46	1 ⇒ (2)

Tab.III.2:
Bestimmung der Linkerlängen für das RWGL-Modell.

Um Abhängigkeiten von der Linkerform, bzw. von der Ausgangskonfiguration, zu bestimmen, wurden für 5Mbp- Schleifen 3 weitere Simulationen angesetzt: Für 2D-Schleifen wurde eine normale Linkerform mit niedriger und hoher EV-WW und für eine 3D-Schleife eine normale Linkerform mit niedriger EV-WW (damit sich die Schleifen entwirren können) gewählt. Darüberhinaus wurde eine Simulation doppelt angesetzt, um die Entwicklung von gleichen Anfangskonfigurationen zu untersuchen. Für Schleifengrößen ab 1Mbp wurden nur noch normale Schleifenformen und normale Linkerformen erzeugt. Zum Nachweis sollte aber eine Simulation mit 3D-Schleifenform bei normaler Linkerform durchgeführt werden. Sie sollte auch als Validitätstest für die dritte zusätzliche Simulation mit der Schleifengröße von 5Mbp dienen.

Bei verschiedenen Schleifengrößen besitzt ein RWGL-Chromosom eine unterschiedliche Zahl von Schleifen, so daß Chromosom 15, mit einem DNA-Gehalt von insgesamt 106Mbp, 20 Schleifen mit 5Mbp und 561 Schleifen mit 126kbp besitzt. Das globale Verhalten wird aber durch die Linkerlänge bestimmt und ist nur in engen Grenzen variabel (Abs.II.5). Die Linkerlänge mußte deshalb spezifisch angepaßt werden (siehe Tab.A.3):

Da der Linker einem Random-Walk folgt, konnte mit Hilfe der Anzahl der Linker (Tab.III.2, Spalte 3) und Gl.II.13 die Linkerlänge b_L bestimmt werden. Der dazu benötigte mittlere quadratische Abstand $< R^2 >$ wurde aus Testsimulationen bestimmt und besitzt einen Wert von $< R^2 > = 4800 \pm 200$. Die Segmente, die diesen Linker aufbauen, folgen wieder einem Random-Walk. Die Zahl der Segmente dieses Zufalls-Weges konnte mit der Segmentlänge von 300nm und wiederum Gl.II.13 bestimmt werden (Spalte5).

Der DNA-Gehalt eines Chromosoms wurde im RWGL-Modell in Schleifen und Linker aufgespalten. Eine Vergrößerung der Linker verringert somit automatisch den DNA-Anteil der Schleifen. Da jedoch der DNA-Gehalt des Linkers noch nicht einbezogen ist, muß die Rechnung wiederholt werden, da sich die Schleifenzahl änderte und damit auch die Zahl der Linker.

Abb.III.8:
Ray-Traced Bilder von Anfangskonfigurationen des RWGL-Modells.

l.o.: 5Mbp-2DSchleifen, Random-Linker, 20 Schleifen
r.o.: 5Mbp-3DSchleifen, Random-Linker, 20 Schleifen
l.u.: 5Mbp-3DSchleifen, normale Linkerschleife, 20 Schleifen
r.u.:126kbp-Schleifen, normale Linker- und Schleifenform, 561 Schleifen

Durch die Diskretisierung auf 300nm-Segmente, erfolgte für 126kbp-Schleifen eine zu große Linkerlänge mit einer Abweichung von ca. 30%. Diese konnte aber zur Bestimmung einer Observablenabhängigkeit von der Linkerlänge im RWGL-Modell benutzt werden (analog zur Simulation des MLS-Modells), obwohl ChromCreate differenziertere Linker zuläßt.

Die so erhaltenen 21 Simulationen werden im Überblick in Tab.A.3 des Anhangs gezeigt. Abb.II.8 zeigt Visualisierungen der Anfangskonfigurationen des RWGL-Modells.

III.4.5 Simulationsansatz anderer Modelle

Abschließend wurden noch die TAK-Modelle und drei lineare Ketten simuliert. Die linearen Ketten, die bei niedriger und hoher EV-WW simuliert wurden, dienten dabei als Vergleich und zu Fehlersuche in der Simulationssoftware. Sie unterscheiden sich in den Attributen der Segmente und damit in den ausgeführten Monte-Carlo-Moves. In Tab.A.4 sind wiederum die Simulationsansätze niedergelegt.

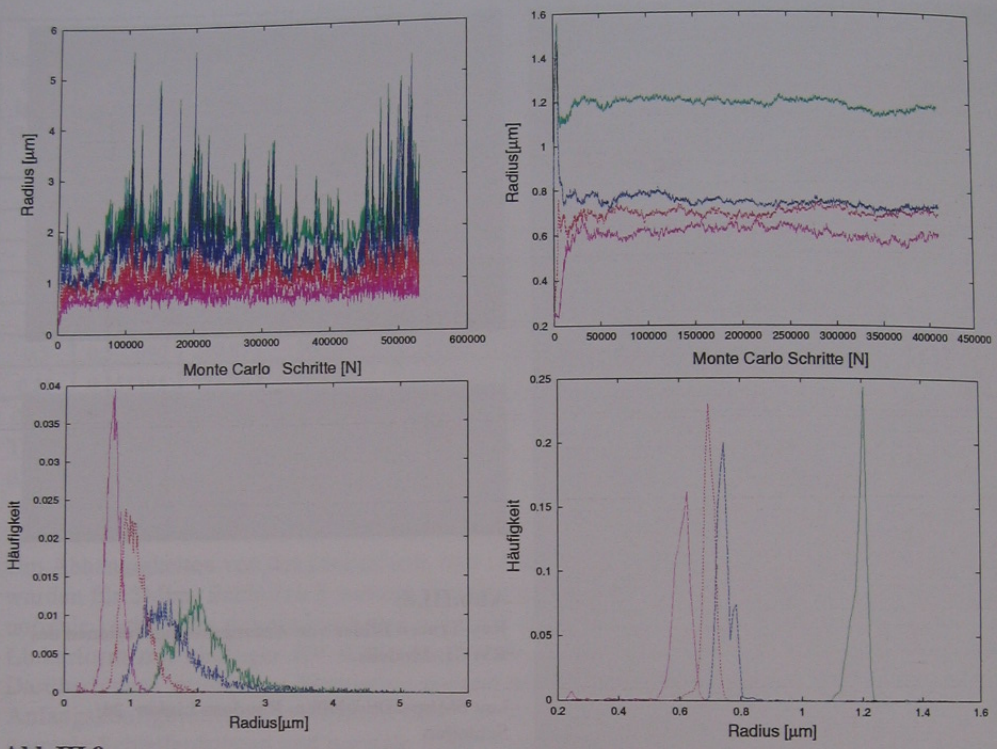


Abb.III.9:

Oben: Darstellung des Gyrationsradius (grün) und der Eigenwerte des Trägheitstensors (nach absteigender Größe: blau, rot , rosa) für das MLS-Modell bei links niedriger und rechts hoher EV-WW.

III.4.6 Simulationsdurchführung:

Insgesamt wurden 49 Simulationsansätze erzeugt. Da eine Simulation mit hoher Auflösung, d.h. kleiner Segmentlänge, in Anbetracht der Rechenzeit nicht möglich war, wurden die Simulationen in zwei Schritte aufgespalten.
Im ersten Schritt wurden Monte-Carlo-Simulationen bei einer Segmentlänge von 300nm durchgeführt. In einem zweiten Schritt wurde die Segmentlänge dann auf 50nm gesenkt und mit Brownscher Dynamik nachrelaxiert, so daß man zu einer hohen Auflösung gelangte.

Für die Simulationsdurchführung wurde das von Münkel entwickelte Programm „VirtNucSim“ verwendet. Die Simulationen wurden dabei auf der IBM-SP2 mit 80 Knoten im Deutschen Krebsforschungszentrum und auf der IBM-SP2 mit 512 Knoten der Universität Karlsruhe durchgeführt. Insgesamt wurden 23.6 Millionen Monte-Carlo Schritte und 4,9 Millionen Brownsche-Dynamik Schritte berechnet. Insgesamt benötigten die Simulation 5,5 Jahre CPU-Zeit auf einem R6000 Prozessor.

Monte-Carlo-Simulationen:
Mit der maximal möglichen Segmentlänge (Abschnitt III.1.2) von 300 nm wurde eine statistisch aussagekräftige Anzahl von Monte-Carlo Schritten durchgeführt. Jede 1000ste Konfiguration, jede 100ste Energie und jeder 100ste Gyrationsradius mit den Eigenwerten des

dazugehörigen Trägheitstensors wurden abgespeichert. Aus dem Gyrationsradius und den Eigenwerten wurde mit Hilfe der jeweiligen Häufigkeitsverteilungen entschieden, wann genügend Konfigurationen vorhanden waren. Dies beruhte auf Untersuchungen, in denen die Werte des Gyrationsradius als Funktion der Monte-Carlo-Schritte gegeneinander verschoben und mit dem Statistikprogramm JMP [SAS96] eine Korrelationsanalyse durchgeführt wurde. Dieses Verfahren wurde stichprobenhaft vorgenommen. Die daraus gewonnenen Ergebnisse ergaben mit zusätzlich erzeugten Visualisierungen der Konfigurationen, daß jede 2000ste bis 5000ste Konfiguration statistisch unabhängig war. Zwischen 200.000 und 500.000 Schritte wurden benötigt, um genügend Konfigurationen für eine Auswertung zu besitzen (Tab.A.1, Tab.A.2, Tab.A.3 und Tab.A.6).

Brownsche-Dynamik-Nachrelaxation:
Nachdem die Monte-Carlo-Simulationen genügend viele unabhängige Konfigurationen erzeugt hatten, wurde die Auflösung der Modelle erhöht. Die Segmentlänge wurde dabei durch die Teilung der Segmente von 300nm auf 50nm (≈ 5300bp) abgesenkt. Anschließend wurden 1000 Brownsche-Dynamik-Schritte durchgeführt, um eventuelle nichtphysikalische Artefakte der Monte-Carlo-Dynamik zu beseitigen. Pro Simulation wurden hierzu 100 Konfigurationen ausgewählt, d. h. jede 2000ste bis 5000ste Monte-Carlo-Konfiguration. Die statistische Unabhängigkeit konnte durch eine Analyse der Energie, des Gyrationsradius und durch Visualisierungen wie oben beschrieben gewonnen werden. Für das Herauskopieren und die Segmentlängenteilung wurden hierfür die Programme RelaxCopyConfig und RelaxKuhnToBending entwickelt.
RelaxCopyConfig ergzeugt dabei auch die für die SP2 notwendigen Process of Execution Files (POE). RelaxKuhnToBending verlangt neben der Eingabe der neuen Segmentzahl zusätzlich auch die Segmentlänge und des DNA-Gehalts für Segmente in Schleifen und Linker. Durch geschickte Wahl können dabei die Segmente gedehnt oder gestaucht werden, d. h. die Schleifen relaxieren zu etwas größeren oder kleineren Längen. Hiermit wird eine Verfeinerung der Modellparameter erreicht, die gegenüber einer völligen Neuberechnung mit Monte-Carlo-Schritten ca. 40% CPU-Zeit einspart.
Die 4900 Nachrelaxationen bilden eine breite und über verschiedene Modelle gestreute Grundlage für die Untersuchung der Chromosomendynamik im Interphasezellkern, allerdings ohne die wünschenswerte Dekondensierung aus der Metaphase in die Interphase.

III.5 Ergebnisse der Simulationsanalyse

Eine Gesamtanalyse mit Geometry liefert 51 Kurven pro Simulation. Observable, die lokale Aussagen machen, sind nur für die nachrelaxierten Simulationen (hohe Auflösung) sinnvoll. Bis zur Abgabe dieser Arbeit konnten zwar die Nachrelaxationen vollständig durchgeführt werden, eine Analyse war jedoch nur für die Monte-Carlo-Simulationen möglich.
Somit wurden hier nur die Observablen FromBegin, RandomPairs, radiale Aufenthaltswahrscheinlichkeit und Dichte, die Segmentlängenverteilung und die fraktale Dimension für die Analyse verwendet.
In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der einzelnen Observablen detailliert dargestellt. Eine Übersicht über die gefundenen Parameterabhängigkeiten wird dabei in der Zusammenfassung der Simulationen (Abs.VI.1) gegeben werden. Die Ergebnisse der Simulation „anderer" Modelle wird in Abschnitt III.5.4 erfolgen.

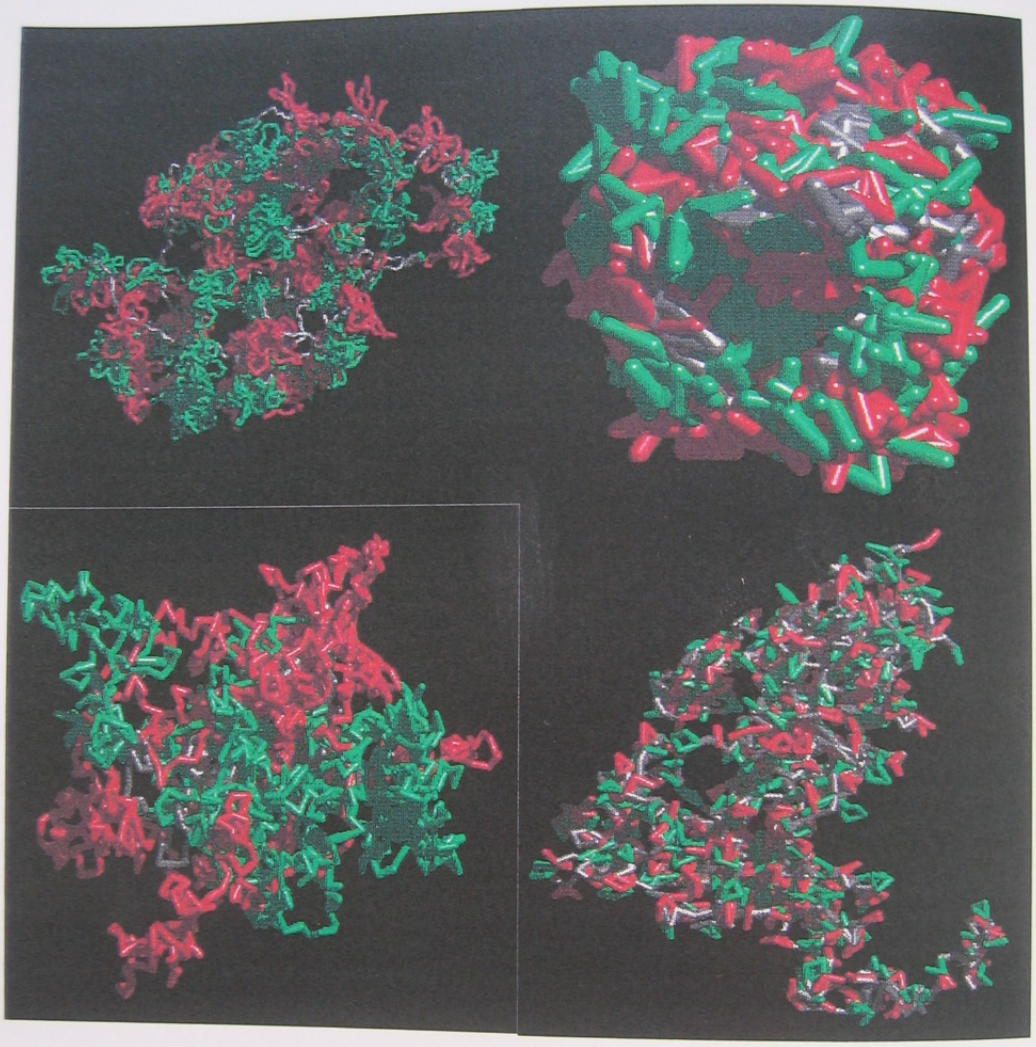


Abb.III.10:
Darstellung verschiedener Simulationen nach 200.000 Monte Carlo Schritten. Banden sind abwechselnd rot und grün gefärbt.
O.L.: MLS-Modell mit niedriger EV-WW, zusätzlich nachrelaxiert. Deutlich sind die distinkten Subkompartimente zu sehen.
O.R.: MLS-Modell bei hoher EV-WW in 2facher Vergrößerung.
U.L.: RWGL-Modell, 5Mbp-Schleifen können sich stark mischen und bilden keine distinkte strukturelle Einheiten.
U.R.: RWGL-Modell mit 126kbp-Schleifen. Kleine Schleifen mischen sich nicht, bilden aber auch keine Subkompartimente.

Fehler der Observablen:
Für die Analyse wurden die Observablen über die verschiedenen Konfigurationen einer Simulation gemittelt. Die Fehler der jeweiligen Observablen ergeben sich nun aus der Standardabweichung dieser Mittelung, dividiert durch die Wurzel der Anzahl der unabhängi-

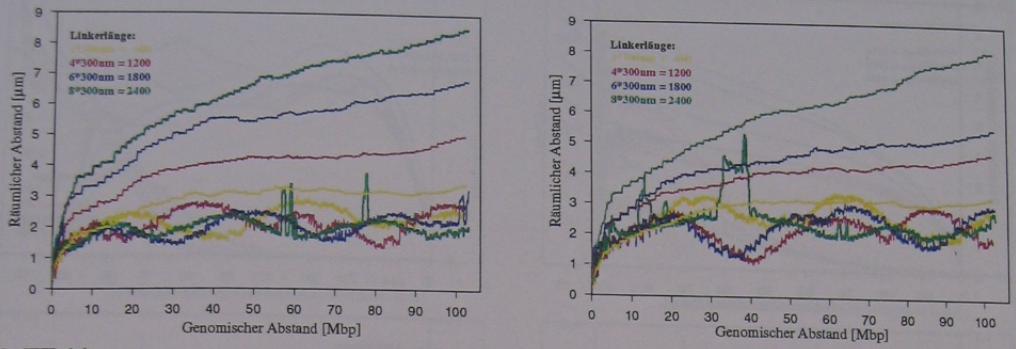


Abb.III.11:

FromBegin in Abhängigkeit von der Linkerlänge und EV-WW links für die Cis-Anordung und rechts für die Trans-Anordnung (die vier unteren, wellenförmigen Kurven .

gen Konfigurationen, über die der Mittelwert gebildet wurde. Untersuchungen ergaben, daß der Fehler in der Größenordnung von weniger als 3% des Wertes der Observablen liegt. Da dies sowohl durch die Testsimulationen, als auch durch Stichproben in diesen und Simulationen von Münkel bestätigt wurde, wird im weiteren nur noch bei besonderem Anlaß auf Observablenfehler eingegangen.

Allgemeine Aussage über die Monte-Carlo -„Dynamik“:

Schon während der Durchführung unterschieden sich Simulationen mit hoher und niedriger EV-WW stark in ihrer Monte-Carlo-„Dynamik“. Bei geringer EV-WW (Abb.III.10, oben) konnte die Chromatinfaser relativ leicht andere Chromatinfasern durchdringen oder in andere Chromosomen-Territorien eindringen. Weiterhin zeigte sie hohe räumliche Flexibilität und eine relativ große Standardabweichung der Verteilung des Gyrationsradius. Hohe EV-WW führte dagegen zu wesentlich kompakteren Strukturen mit statischerer Dynamik (geringer Standardabweichung, Abb.III.9). Beim MLS-Modell bildeten sich kugelförmige Strukturen mit wenig strukturierter bzw. zugänglicher Oberfläche (Abb.III.10, o.r.). Falls es Teilen des Subkompartimentes gelungen war, sich weit genug aus dem Potentialtopf zu entfernen, so blieben sie dort quasi gefangen.

Die unterschiedliche Form und Größe der Anfangsstruktur führte hierbei zu unterschiedlicher Enwicklung des mittleren Gyrationsradius: große Anfangskonfigurationen zeigten abnehmende Gyrationsradien und umgekehrt. Im Mittel wurden ca. 50.000 Schritte gebraucht, um den Mittelwert zu erreichen. Für die mitunter großen Schwankungen des Gyrationsradius (Abb.III.9, o. r., und zum Vergleich idem, o.l., u. l., u. r.) konnte bisher noch keine Erklärung gefunden werden.

III.5.1 Analyse des MLS-Modells

Da die Simulationen in zwei Felder von Parametern aufgespalten wurde, soll diese Trennung auch hier durchgeführt werden:

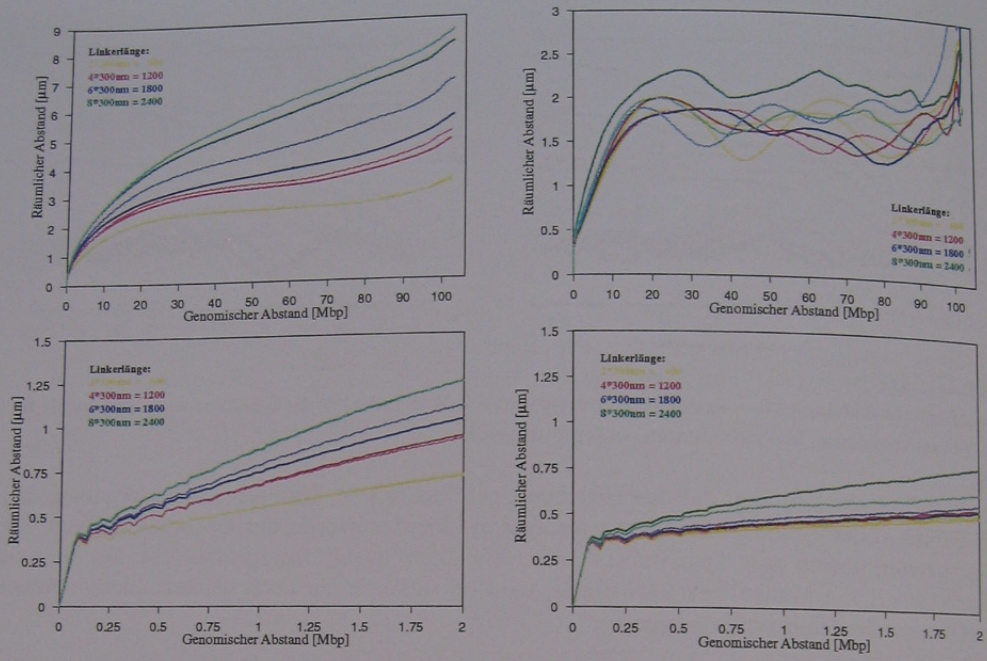


Abb.III.12:

RandomPairs von oben nach unten mit verschiedener Auflösung, links für niedrige und rechts für hohe EV-WW, bzw. die Cis-Anordnung (sie ist jeweils in dem helleren Farbton dargestellt).

Feld 1

FromBegin:

FromBegin ist in Abhängigkeit vom genomischen Abstand, für verschiedene Linkerlängen und EV-WW in Abb. III.10 links für die cis-Anordnung und rechts für die trans-Anordnung der Schleifen aufgetragen.

EV-WW = 0,1kT:

Mit wachsender Linkerlänge nimmt der mittlere räumliche Abstand zu, d. h. das Chromosom dehnt sich aus. Das Chromosom verhält sich damit wie eine Polymerkette, die man bei geringen äußeren Zwangsbedingungen vergrößert. Dies ist durch die niedrige Höhe des Potentialtopfes gegeben.

EV-WW = 1,0 kT:

Mit wachsender Linkerlänge nimmt der mittlere räumliche Abstand nicht zu, da die Höhe des Potentialtopfes zu hoch ist und eine Ausdehnung verhindert.

Der räumliche Abstand schwankt dabei mit einer zufälligen Periode. Das Chromosom wickelt sich wie ein Schlauch zu einer Art Torus zusammen, wobei das Zustandekommen einer Nachbarschaft zwischen zwei Chromosomenteilen statistisch ist. Visualisierungen zeigen, daß das Chromosom sich von seinem Anfangszustand ausdehnt, an den Topfrand stößt und sich dann in die Torusform faltet. Aufgrund der hohen EV-WW finden nun Umlagerungen großer Teile des Chromosoms kaum mehr statt, so daß eine Relaxation nicht mehr erfolgen kann.

Generell liegen die Abstände niedriger als bei EV-WW = 0,1 kT.

Die Ausschläge zu hohen Werten für eine Linkerlänge von 2400 nm zeigen, daß ein Teil des Chromosoms sich über den Rand des Potentialtopfes hinausbegeben hat und dort verblieben

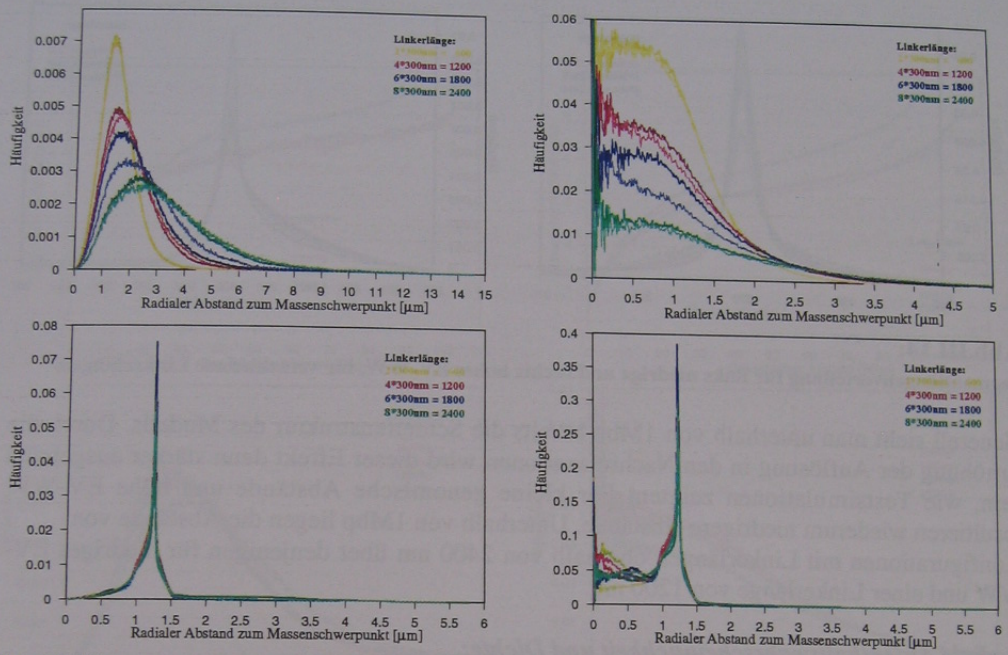


Abb.III.13:

Radiale Aufenthaltswahrscheinlichkeit links und Dichte rechts, oben für niedrige, unten für hohe EV-WW, für verschiedene Linkerlängen, wobei die helleren Fartöne die Cis-Andordnung darstellen.

ist. Dies ist dadurch erklärbar, daß die benötigte Energieänderung viel zu hoch ist, so daß die Akzeptanzrate des Monte-Carlo-Verfahrens zu stark absinkt.
Ob dieses Verhalten und die zufällige periodische Schwankung ein intrinsischer Effekt der hohen EV-WW oder zu geringer Simulationsdauer ist, ist bisher unentscheidbar. Der Effekt ist jedoch noch bei 750.000 Monte-Carlo-Schritten festzustellen, wogegen bei niedriger EV-WW 400.000 Schritte ausreichen, um das Chromosom zu relaxieren.

RandomPairs:

RandomPairs ist für verschiedene Linkerlängen und Schleifenanordnungen für niedrige EV-WW (0,1 kT) in Abb.III.12, linke Seite, und für hohe EV-WW in Abb.III.12, rechte Seite, darlegt. Durch die enge Verwandschaft von FromBegin und RandomPairs lassen sich die Begründungen und Folgerungen von FromBegin übernehmen:

EV-WW = 0,1kT:

Die räumlichen Abstände nehmen mit wachsender Linkerlänge zu .
Es zeigt sich jedoch eine Abhängigkeit von der Schleifenanordnung: Die cis-Anordnung liefert größere Abstände für Linkerlängen ab 1200nm (Abb.III.12, links unten). Eine Erklärung gibt es hierfür bisher nicht.

EV-WW = 1,0 kT:

Die räumlichen Abstände nehmen mit wachsender Linkerlänge nicht zu.
Aufgrund der Mittelwertbildung ist das Überschreiten des Potentialtopfes nicht mehr festzustellen. Eine Abhängigkeit von der Schleifenanordnung ist nicht zu erkennen (Abb.III.12, unten).

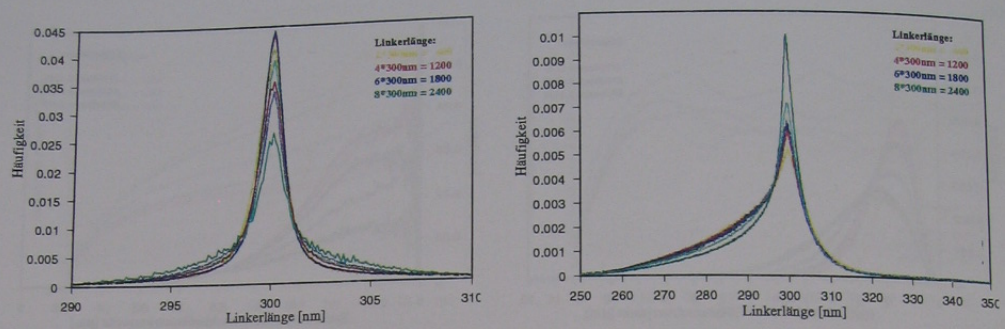


Abb.III.14:
Segmentlängenverteilung für links niedrige und rechts hohes EV-WW, für verschiedene Linkerlängen.

Generell sieht man unterhalb von 1Mbp bereits die Schleifenstruktur des Modells. Durch die Erhöhung der Auflösung in den Nachrelaxationen wird dieser Effekt dann stärker ausgeprägt sein, wie Testsimulationen zeigten. Für kleine genomische Abstände und hohe EV-WW resultieren wiederum niedrigere Abstände. Unterhalb von 1Mbp liegen die Abstände von Konfigurationen mit Linkerlängen oberhalb von 2400 nm über denjenigen für niedriges EV-WW und einer Linkerlänge von 1200 nm.

Radiale Aufenthaltswahrscheinlichkeit und Dichte:
Aus unterschiedlichen räumliche Abständen wie FromBegin und RandomPairs resultiert auch eine Veränderung der radialen Aufenthaltswahrscheinlichkeit und Dichte.

EV-WW = 0,1 kT:
Das Maximum der Aufenthaltswahrscheinlichkeit nimmt mit zunehmender Linkerlänge ab (Abb.III.13, oben links). Es verschiebt sich dabei zu größeren radialen Werten, und die Breite der Verteilung nimmt zu, da das Chromosom ausgedehnter ist (FromBegin, RandomPairs).
Das Plateau konstanter Dichte (Abb.III.13, rechts oben) nimmt bei einer Erhöhung der Linkerlänge ebenfalls ab. Kompensiert wird dies durch einen flacheren und längeren Abfall der Dichte zu größeren Radien hin.
Der Durchmesser (soweit man bei einem so dynamischen Gebilde hiervon überhaupt sprechen kann) von Chromosom 15 beträgt somit also zwischen 4 µm und 5 µm. Ein Vergleich beider Observablen zeigt darüberhinaus, daß sich vor allem bei großer Linkerlänge der größte Teil des Chromosoms in der Randzone befindet und frei zugänglich ist. Die bereits beschriebenen Abhängigkeiten von der Schleifenanordnung lassen sich in unausgeprägter Form ebenfalls wiederfinden.
EV-WW = 1,0 kT:
Die Aufenthaltswahrscheinlichkeit und die Dichte zeigen einen scharfen Peak. (Abb.III.13, links unten und Abb.III.13, rechts unten). In diesem befinden sich 7,5 % des Chromosoms, die Dichte ist hier extrem hoch. Die radiale Ausdehnung ist unter 1,5 µm beschränkt. Diese beträgt etwas mehr als die mittlere Ausdehnung des Potentialtopfes bei hoher EV-WW. Folglich ist das Chromosom genau auf sein Volumen beschränkt. Im Zusammenhang mit FromBegin und RandomPairs wird nun klar, daß das Chromosom sich nicht nur zu einem Torus einfaltet, sondern auch gegen die Wand es Potentialtopfes gepresst wird. Durch die starke Konzentration im Randbereich ist im Innern die Dichte geringer.
Durch den scharfen Peak ist die Randzone sehr dünn, so daß eine unzugängliche „Oberflächenschicht" entsteht.

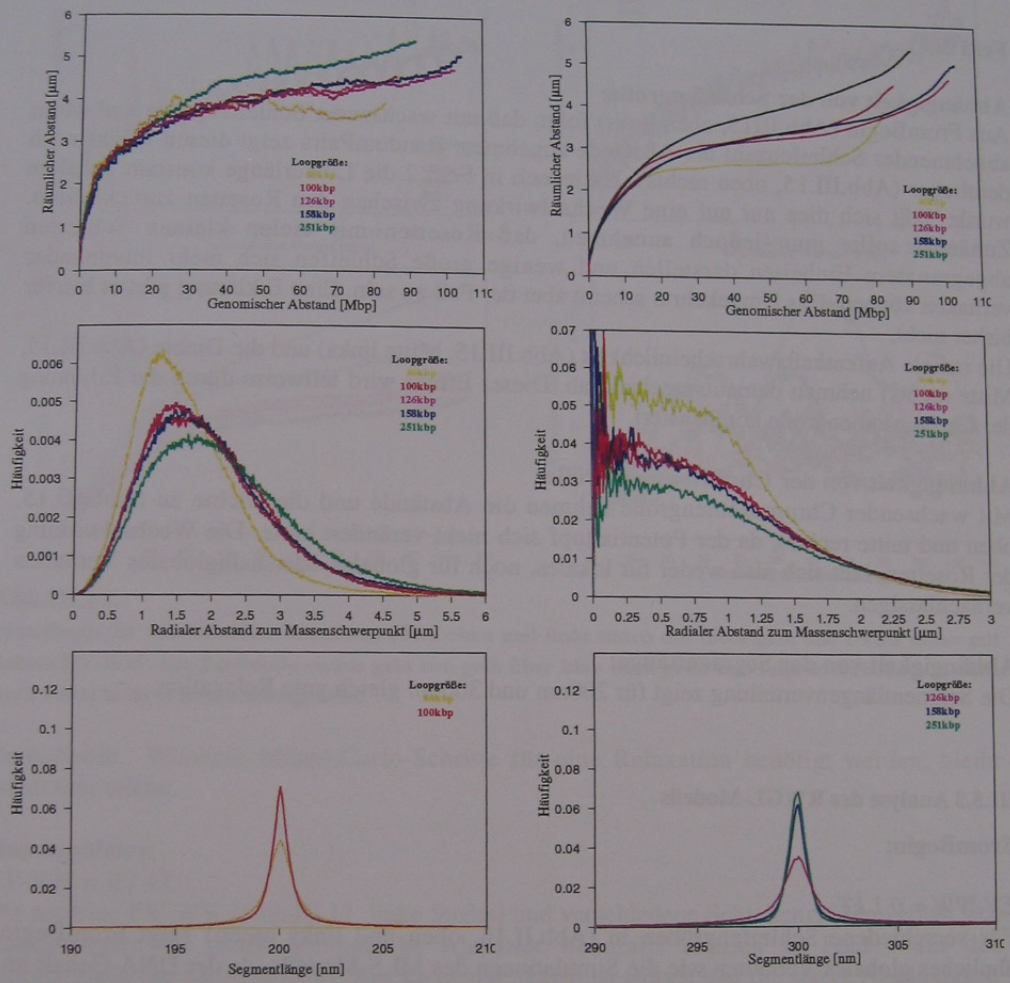


Abb.III.15:

MLS-Feld 2: FromBegin oben links, RandomPairs oben rechts, radiale Aufenthaltswahrscheinlichkeit Mitte links, radiale Dichte Mitte rechts, Segmentlängenverteilungen für 200nm-Segmente unten links und 300nm-Segmente unten rechts.

Segmentlänge:

EV-WW = 0,1 kT:

Die Segmente sind für niedriges EV-WW (Abb.III.14, links) sehr gut relaxiert, da die Verteilung scharf und symmetrisch ist.

EV-WW = 1,0 kT:

Bei hoher EV-WW (Abb.III.14, rechts) zeigt sich jedoch eine schlechte Relaxierung, da die Verteilung zu kleinen Segmentlängen unsymmetrisch verschoben sind. Der Chromatinfaden steht also unter erheblichem Druckstreß, da er gegen die Wand des Potentialtopfes gedrückt wird, wie die Dichte anschaulich zeigte. Die schlechte Relaxierung deutet dabei auf eine Simulierung mit zu wenigen Monte-Carlo-Schritten hin.

Feld 2:

Abhängigkeit von der Schleifengröße:
Aus FromBegin (Abb.III15, oben links) folgt, daß mit wachsender Schleifengröße und damit abnehmender Schleifenzahl die Abstände zunehmen. RandomPairs zeigt diesen Effekt noch deutlicher (Abb.III.15, oben rechts). Da jedoch in Feld 2 die Linkerlänge konstant gehalten wurde, läßt sich dies nur auf eine Wechselwirkung zwischen den Rosetten zurückführen. Zunächst sollte man jedoch annehmen, daß Rosetten mit vielen kleinen Schleifen abgegrenztere Einheiten darstellen und wenige große Schleifen sich mehr inneinander verhaken können. Das Umgekehrte scheint aber der Fall zu sein. Eine Erklärung gibt es hierfür bisher nicht.
Die radiale Aufenthaltswahrscheinlichkeit (Abb.III.15, Mitte links) und die Dichte (Abb.III.15, Mitte rechts) nehmen dementsprechend ab. Dieser Effekt wird teilweise durch die Erhöhung der Chromosomengröße kompensiert.

Abhängigkeit von der Chromosomengröße:
Mit wachsender Chromosomengröße nehmen die Abstände und die Dichte zu (Abb.III.15, oben und mitte rechts), da der Potentialtopf sich nicht verändert hatte. Die Wechselwirkung der Rosetten, läßt sich also weder für lokales, noch für globales oder halbglobales Verhalten vernachlässigen.

Abhängigkeit von der Segmentlänge:
Die Segmentlängenverteilung zeigt für 200nm und 300nm gleich gute Relaxation.

III.5.2 Analyse des RWGL-Modells

FromBegin:

EV-WW = 0,1 kT:
Für verschiedene Schleifengrößen in (Abb.II.16, oben und links unten) zeigt FromBegin ähnliches globales Verhalten wie die Simulationen des MLS-Modells, da der DNA-Gehalt im Linker für RGWL- und MLS-Modell ähnlich gewählt wurden. Dies bedeutet, daß nur der Linker, aber nicht die Schleifengröße einen Einfluß auf globales Verhalten haben.
Für kleine genomische Abstände erhält man eine starke Modulation, da es sich um große Schleifen handelt. Die scheinbare Verkleinerung der Schleifen läßt sich durch immer unschärfere Mittelung für große genomische Abstände erklären.
Vergrößert man die Linkerlänge, so ist wie in beim MLS-Modell ein generelles Anwachsen des Abstandes festzustellen. Für hohe EV-WW zeigt Abb.III.16, rechts unten, ein ähnliches Verhalten wie in Feld 1 der Simulationen des MLS-Modells, allerdings ohne ausgeprägte

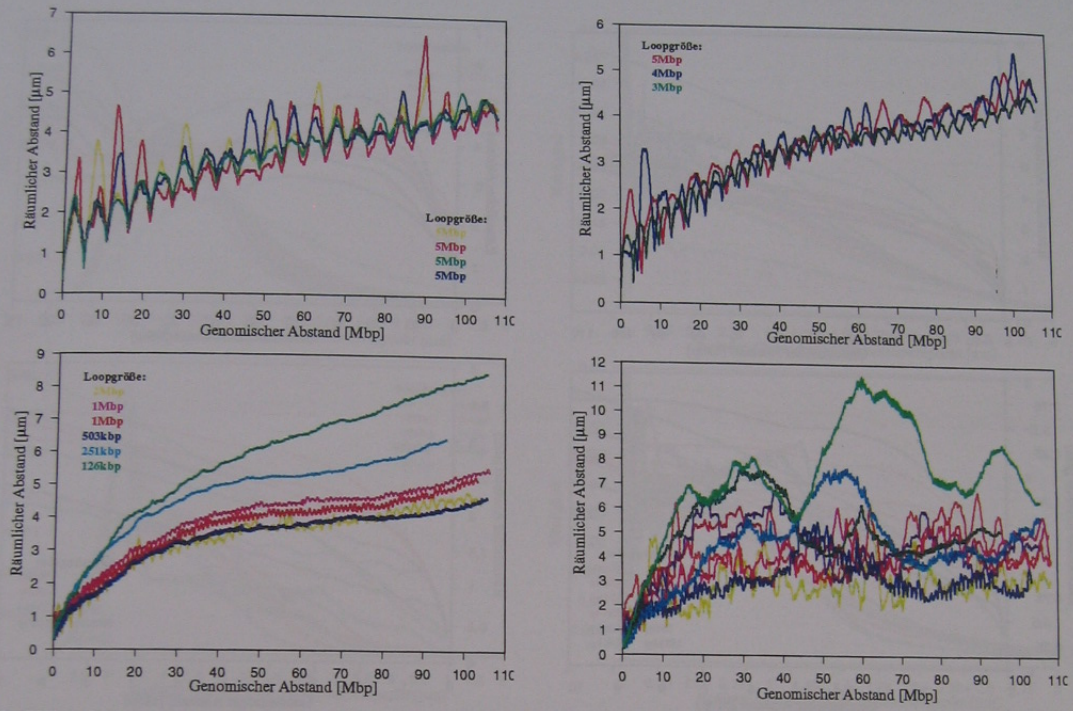


Abb.III.16:

FromBegin für verschiedene Schleifengrößen, oben und links unten mit niedrigem und rechts unten mit hohem EV-WW. Die Farbskala rechts geht von gelb über blau nach grün und folgt so Tab.A.3 von oben nach unten in ihrer Bezeichnungsweise.

Periodizität.. Wieviele Monte-Carlo-Schritte für eine Relaxation benötigt werden, bleibt wiederum unklar.

RandomPairs:

EV-WW = 0,1 kT:

Für niedrige EV-WW (Abb.III.17, linke Spalte) und verschiedene Schleifengrößen verhält sich RandomPairs für große genomische Abstände ebenfalls ähnlich zu Feld 1 aus den Simulationen des MLS-Modells. Auf kleineren Skalen ist jedoch klar die starke Abhängigkeit von der Schleifengröße und die Schleifenstruktur zu erkennen. Ein deutlicher Effekt der Form der Schleife und des Linkers und somit der Ausgangskonfiguration ist zu erkennen. Die Steilheit des Anstieges für kleine genomische Abstände ist mit dem Random-Walk einer freien Kette erklärbar. Die Zwangsbedingungen für die Segmente in der Schleife nimmt dabei mit steigender Schleifengröße ab. Die Vergrößerung des Abstandes mit steigender Linkerlänge verhält sich analog zu Feld 1 der MLS-Simulationen.

EV-WW = 1,0 kT:

Für hohe EV-WW ergeben sich grundsätzlich größere Abstände als bei niedriger EV-WW. Wie in FromBegin schon erläutert, falten sich die Anfangskonfigurationen von außerhalb in

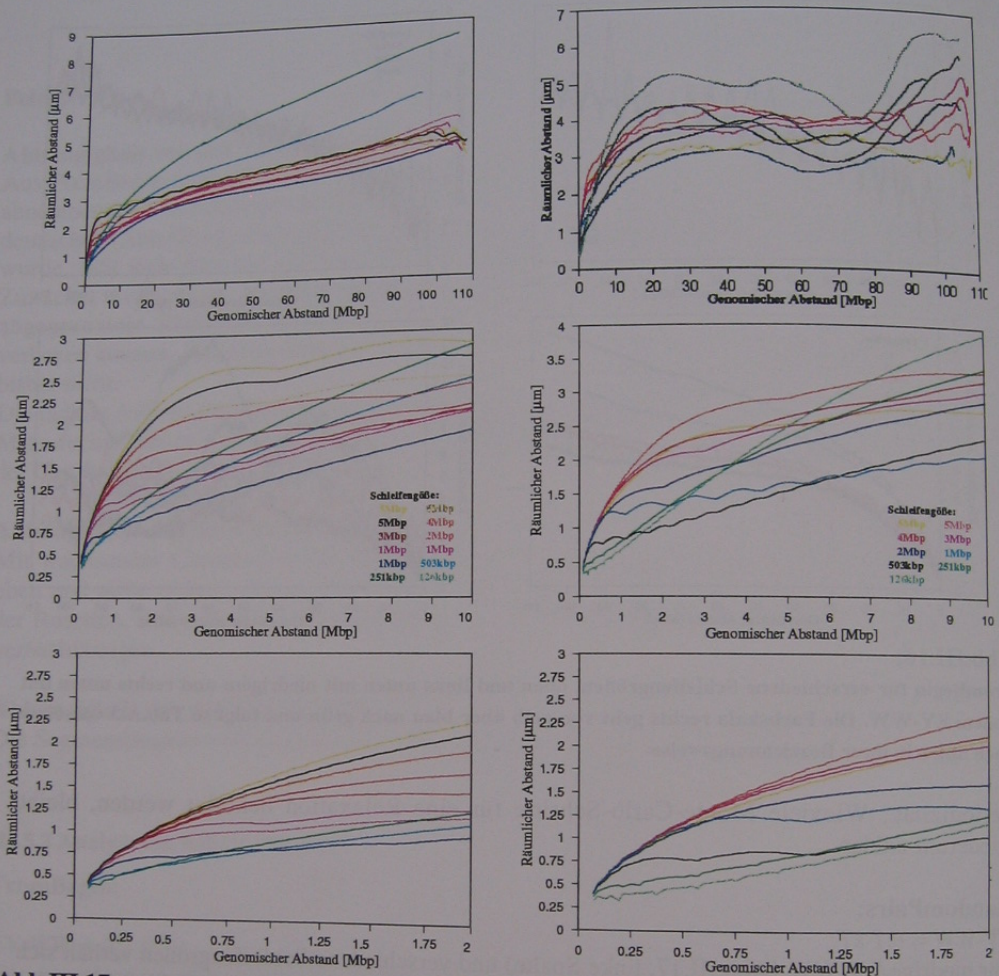


Abb.III.17:
RandomPairs mit verschiedenen Schleifengrößen, links für niedriges, rechts für hohe EV-WW.

den Potentialtopf hinein. Die Schleifen benötigen somit recht lange, um sich in dieses Volumen hineinzufalten. Dies gilt auch für größere Linkerlängen, was diesen Effekt noch verstärkt.

Radiale Aufenthaltswahrscheinlichkeit und Dichte:
EV-WW = 0,1 kT:
Das Maximum der Aufenthaltswahrscheinlichkeit für verschiedene Schleifengrößen und niedrige EV-WW liegt bei etwa 2µm (Abb.III18, oben links). Mit abnehmender Schleifengröße wächst der Maximumwert an, um für kleine Schleifen wieder mit größerem Linker gegenüber dem Anfangswert abzunehmen. Für die Dichte gilt entsprechendes (Abb.III.18, oben rechts). Der Effekt ist darauf zurückzuführen, daß kleinere Schleifen sich leichter in den Zwischenräumen anderer Schleifen aufhalten können. Hierdurch entsteht bei kleinen Schleifen auch ein ausgeprägteres Plateau. Für große Schleifen, die sich auch einfacher in äußere Bereiche ausdehnen können, nimmt deshalb das Plateau konstant ab. Für den

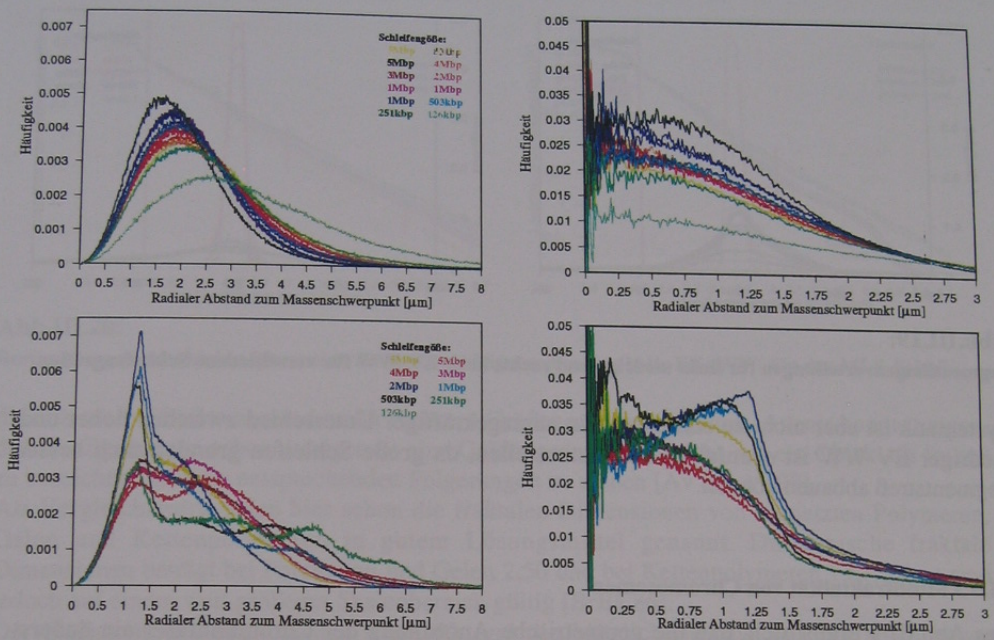


Abb.III.18:

Radiale Aufenthaltswahrscheinlichkeit, links, und Dichte, rechts, für oben niedrige und unten hohe EV-WW für verschiedene Schleifengrößen.

Durchmesser eines Chromosomenterritoriums ergeben sich somit auch etwas größere Werte als in Feld 1 der MLS-Simulationen.

EV-WW = 1,0 kT:

Für hohe EV-WW tritt eine starke Konzentrierung des Chromosoms auf (Abb.III.18, links unten). Die Aufenthaltswahrscheinlichkeit besitzt ein Maximum, das, wie bei den Simulationen des MLS-Modells, bei 1,24 µm liegt. Daran schließt ein zweites Maximum oder Plateau an.

Die Dichte (Abb.III.18, rechts unten) zeigt eine stärkere Plateaubildung mit einer Kante, bzw. bei scharfem und hohem ersten Maximum einen leichten Peak bei 1,24 µm. Innerhalb der 1,24 µm-Zone tritt dabei eine gleichmäßige Dichte auf, die etwas stärker als bei niedriger EV-WW abfällt. Die hohe Aufenthaltswahrscheinlichkeit außerhalb dieser Zone ist auf die lange Zeit zurückzuführen, die benötigt wird, um sich aus der Anfangskonfiguration in durch andere Schleifen freigegebene Bereiche hineinzufalten. Anhand von Visualisierungen kann gezeigt werden, daß die Schleifen dabei sehr dynamisches Verhalten zeigen, d. h. sie bewgen sich stark. Im Vergleich zu niedrigem EV-WW gibt es keine systematischen Abhängigkeiten.

Segmentlänge:

EV-WW = 0,1 kT:

Für hohes und niedriges EV-WW und verschiedene Schleifenlänge ergeben sich gegenüber dem MLS-Modell schärfere Segmentlängenverteilungen (Abb.III.19). Die Segmente sind also sehr gut relaxiert und stehen unter wesentlich geringerem Streß. Dieser nimmt mit sinkender Schleifengröße und zunehmenden topologischen Randbedingungen jedoch leicht zu. Eine klare

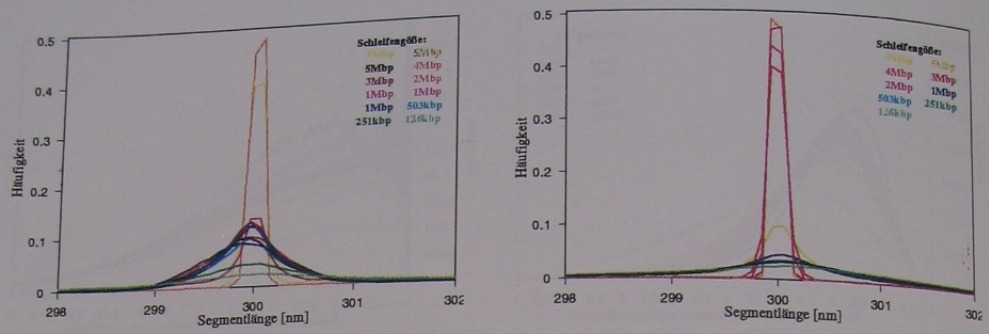


Abb.III.19:
Segmentlängenverteilungen für links niedrige und rechts hohe EV-WW für verschiedene Schleifengrößen.

Systematik ist aber nicht zu erkennen. Ein aussagekräftiger Unterschied zwischen hoher und niedriger EV-WW ist ebenfalls nicht festzustellen, da große Schleifen grundsätzlich besser Segmentstreß abbauen können.

III.5.3 Multifraktalität von Chromosomen

Aus Abb.III.9 ergibt sich, daß die geometrische Anordnung der Chromatinfaser ein äußerst komplexes Verhalten aufweist, wie es typisch für die in Abschnitt II.2 beschriebenen fraktalen Systeme ist. Hierzu wurde die fraktale Dimension aus den Log-Log Kurven bestimmt. Der hierzu benötigte Fit (KaleidaGraph, Version 3.08 für Macintosh) wurde so optimiert, daß der Korrelationskoeffizient möglichst groß wurde. Die negative Steigung des linearen Fits ist die fraktale Dimension.
Allgemein wurden folgende Phänomene für alle Simulationszyklen festgestellt:

Euklidischer Cut-Off:
Wird das Maß wesentlich kleiner gewählt als die Segmentlänge, dannwird die fraktale Dimension eines euklidischen Körpers (hier einer Linie mit fraktaler Dimension 1) bestimmt. Da die Segmentlänge 300 nm betrug, wurde für einen Maßbereich von 5 nm bis 300 nm eine fraktale Dimension von 1,05 bis 1,08 gefunden. Kurz vor dem Maßwert 300 nm befindet sich ein kleiner Anstieg in der Kurve. Da die Maßstäbe selbst ganze euklidische Maße darstellen, messen sie dort die Segmente besonders gut aus. Die Breite des Anstiegs und die Abweichung der fraktalen Dimension von 1 ist auf die Verteilung der Segmentlängen zurückzuführen.

Korrelationskoeffizient R der Anpassung:
Der Korrelationswert beträgt in den meisten Fällen 0,999±0,001. Ein solch hoher Korrelationskoeffizient war nicht zu erwarten gewesen. Für die Anpassung wurde die maximal mögliche Anzahl von Punkten verwendet. Da der Fehler eines Meßpunktes unterhalb der Linienbreite einer Kurvendarstellung liegt, kann geschlossen werden, daß der Fehler bei der Bestimmung der fraktalen Dimension nicht mehr als ± 0,01 beträgt.

Multifraktalität:
Es treten 2-4 Zonen mit unterschiedlicher fraktaler Dimension zwischen 300 nm und 5000 nm auf. Die Zonen überdecken damit weniger als eine Größenordnung. Obwohl ein fraktales Objekt im reinen mathematischen Sinne unendlich viele Größenordnungen überdeckt, sollte

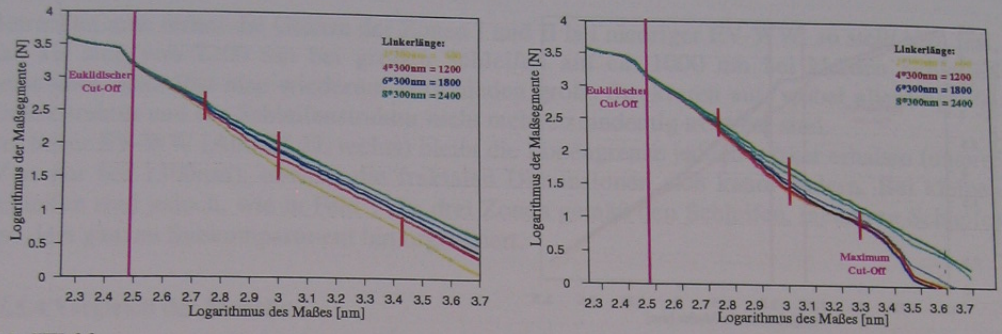


Abb.III.20:
Bestimmung der fraktalen Dimension für links niedrige und rechts hohe EV- WW, für das MLS-Feld 1.

dies für reale Objekte zumindest für mehrere Größenordnungen gelten. Avenir konnte zeigen, daß im allgemeinen schon weniger als eine Größenordnung ausreicht, um ein Objekt als fraktal zu bezeichnen und die entsprechenden Folgerungen zu ziehen [Av 89, Av 98].
Als Vergleichswerte seien hier schon die fraktalen Dimensionen von vernetzten Polymeren, Gelen und Kettenpolymeren in gutem Lösungsmittel genannt. Die typische fraktale Dimensionen beträgt bei Polymeren und Gelen 2,50 und bei Kettenpolymeren 1,67. Diese sind jedoch auf einem weit größeren Skalenbereich gültig [BrBä 86].
Der Nachweis des euklidischen Cut-Offs und die Möglichkeit, die Fits mit solch hohen Korrelationskoeffizienten zu bestimmen, stellt die Leistungsfähigkeit einer fraktalen Analyse dar und zeigt, daß das Verfahren korrekt implementiert wurde.

Fraktale Analyse des MLS-Modells - Feld 2:
Für niedrige EV-WW (Abb.III.20, links, und Tab.A.5) findet man drei oder vier lineare Zonen mit verschiedener fraktaler Dimension. Die erste Zone reicht von 300 nm bis 560 nm, die zweite von 560 nm bis ca. 1000 nm, die dritte von ca. 1000 nm bis 2500 nm und die vierte von ca. 2500 bis 5000 nm. Im ersten Bereich ist das Maß dabei sensitiv auf eine Schleife, im zweiten auf eine Rosette, im dritten mehrere Rosetten und im vierten schließlich fast ein ganzes Subcompartment. Die unterschiedlichen fraktalen Dimensionen entsprechen also der fraktalen Dimension der jeweiligen strukturellen Einheit. Mit wachsender Linkerlänge nimmt die fraktale Dimension ab, da sie ein Maß für die Raumerfüllung darstellt. Die oben beschriebenen Observablenabhängigkeiten sind also mit der fraktalen Analyse kohärent. Allerdings ist keine Abhängigkeit von der Schleifenanordnung festzustellen. Betrachtet man die Werte genauer, so ergeben sich für Zone I Dimensionen von 2,67 bis 2,20, für Zone II Dimensionen von 3,13 bis 2,42, für Zone III Dimensionen von 2.07 bis 1,98 und für Zone IV, sofern sie auftritt, Dimensionen von 2,43 bis 2,15. Rosetten stellen im allgemeinen also äußerst dichte Gebilde dar, während die Rosetten im Subkompartment recht locker verteilt sind.
Für hohe EV-WW (Abb.III.20, rechts) ergeben sich jedoch neben den zwei ersten Zonen, die grundsätzlich höhere Werte annehmen (Zone I von 2,85 bis 2,62, Zone II von 3,68 bis 2,42), und der dritten Zone mit grundsätzlich niedrigeren Werten im Bereich von 1,70 bis 2,12, eine vierte Zone mit sehr hohen Werten für die fraktale Dimension im Bereich von 4,32 bis 6,33. Bei diesen hohen Werten handelt es sich um den Maximum-Cut-Off, der die maximale Ausdehnung beschreibt. Hier verliert die fraktale Dimension ihre Gültigkeit und Sinn; unter Umständen können hier jedoch Aussagen über den Rand eines Objektes getroffen werden.

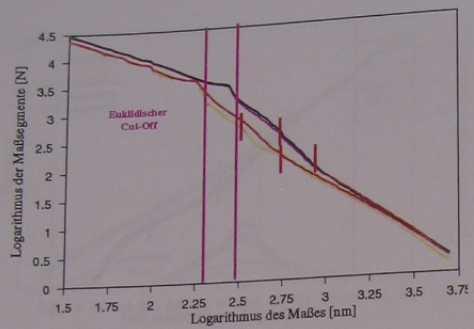


Abb.III.21:
Bestimmung der fraktalen Dimension für das MLS-Feld 2.

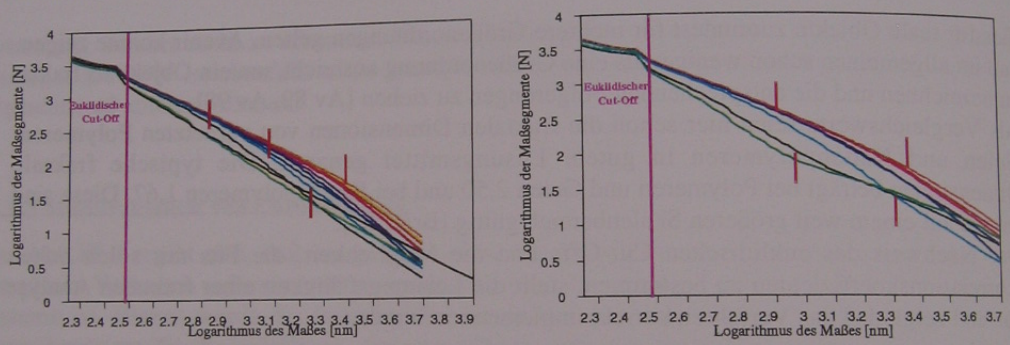


Abb.III.22:
Bestimmung der fraktalen Dimension für links niedrige und rechts hohe EV- WW, für das RWGL-Modell.

Die dritte Zone mit ihren niedrigen Werten bestätigt die oben gemachten Aussagen über die Aufenthaltswarscheinlichkeit und die Dichte (Abb.III.16 und S.48).
Die hohen fraktalen Dimensionen in Zone II ermangeln jedoch bisher einer Erklärung, es könnte sein, daß hier ein Maximum-Cut-Off der Rosetten vorliegt.

Wie nach Feld 1 nicht anders zu erwarten, zeigt sich bei Feld II ebenfalls eine Zonierung der fraktalen Dimension in drei Bereiche (Abb.III.21 und Tab.A.6). In Zone II ist das Zusammenpressen der Schleifen aufgrund der großen Schleifenanzahl in einer Rosette mit kleiner Schleifengröße besonders gut zu sehen. Weiterhin ist aufgrund der unterschiedlichen Segmentlängen von 200nm und 300nm der Anstieg auch bei 200nm zu finden. Durch die scharfe Segmentlängenverteilung ergeben sich nun noch zwei kleinere Anstiege bei 100 nm und 50 nm, was die Begründung des Peaks in den Kurven bestätigt. Die Abhängigkeiten von der Schleifengröße und dem DNA-Gehalt sind wiederum eindeutig nachzuweisen.

Fraktale Analyse des RWGL-Modells:
Für hohe und niedrige EV-WW (Abb.III.22 und Tab.A.7) ergeben sich generell zwei lineare Zonen, die sich nur bei kleiner Schleifengröße in drei aufspalten. Die Werte der fraktalen Dimension reichen in Zone I von 1,76 bis 2,23, und in Zone II von 3,05 bis 2,43. Für eine Schleifengröße von 126kbp ergeben sich hierbei jedoch andere Werte, die durch die größere Linkerlänge bedingt sind.

Betrachtet man ferner die Grenze der Zonen I und II bei niedriger EV-WW, so stellt man fest, daß sie sich von 2200 nm bei großen Schleifen auf ca. 1000 nm bei kleinen Schleifen verschiebt. Man löst also wiederum verschieden große Strukturen auf, wobei allerdings die Linkerstruktur und die Schleifenstruktur nicht mehr so eindeutig trennbar sind.
Bei hoher EV-WW (Abb.III.22, rechts) bleibt die Zonengrenze jedoch stärker erhalten (unterer Wert nur bei 1300nm), obwohl die fraktalen Dimensionen sich kaum ändern. Bei kleinen Schleifen sind jedoch, wie in Feld 1 die drei Zonen gemäß den Schleifen, mehreren Schleifen und dem ganzen Subkompartment hin organisiert.

III.5.4 Vergleich der Modelle

Abschließend soll nun noch ein Vergleich zwischen den Simulationen im Hinblick auf ihre Verwertbarkeit bezüglich der experimentellen Daten erfolgen. Es stellt sich die Frage, ob die Modelle mit den vorhandenen Daten gegeneinander abgrenzbar sind. Da ihre statistische Relevanz eindeutiger ist, wurden hierfür nur Simulationen mit niedriger EV-WW verwendet. Die in den Abbildungen gezeigten Kurven stellen einen repräsentativen Querschnitt dar. Sowohl FromBegin-Abstände als auch die Segmentlängenverteilung werden im folgenden nicht betrachtet, weil sie keine neuen Erkenntnisse über die aus obiger Besprechung resultierenden Ergebnisse erbringen.
Die Analyse der TAK-Modelle ergab, daß die Variation des DNA-Gehalts der einzelnen Banden keine anderen Ergebnisse in den Observablen zeigte, wie beim RWGL-Modell unterscheidet.
Die Simulation der linearen Kette entsprach den theoretischen Vorhersagen. Auf kleinen Skalen folgte sie einem exakten, auf großen Skalen einem, durch den Potentialtopf eingeschränkten, Random-Walk, so daß Simulationsartefakte ausgeschlossen werden können. Die fraktale Dimension der linearen Kette besaß dabei, wie das RWGL-Modell, zwei Zonen. In Zone II verhält sie sich exakt nach der theoretischen Erwartung [Man 83]. Die Zunahme der Dichte auf größeren Skalen spiegelt sich in der größeren fraktalen Dimension wider.

RandomPairs:
Die globale räumliche Abstandsabhängigkeit vom genomischen Abstand läßt keine Unterscheidung zwischen den Modellen zu (Abb.II.23, links oben). Für kleine genomische Abstände können die Modelle jedoch separiert werden (Abb.II.23, rechts oben, und Abb.II.23, links Mitte). Dieser Unterschied ist allerdings von der Schleifengröße und der Linkerlänge abhängig. Für große Schleifen im RWGL-Modell ergibt sich ein klarer Unterschied zum MLS-Modell mit allen verschiedenen Linkerlängen für genomische Abstände unter 3Mbp.
Unterschreiten die Schleifen im RWGL-Modell 500kbp, so ist dies jedoch nur noch eingeschränkt möglich. Berücksichtigt man insbesondere die zu große Linkerlänge in der RWGL-Modell-Simulation mit Schleifen von 126kbp, so ist dies nur noch mit lokalen Observablen möglich, nicht mehr jedoch mit der Observablen RandomPairs.
Dies gilt auch für räumliche Abstände der linearen Kette, die für kleine genomische Abstände wie bei großen Schleifen im RWGL-Modell anwachsen.

Radiale Aufenthaltswahrscheinlichkeit und Dichte:

Weder die radiale Aufenthaltwahrscheinlichkeit, noch die radiale Dichte, wie sie in Abb.II.23 links unten und Abb.III.23 rechts unten gezeigt sind, erlauben es grundsätzlich, zwischen den

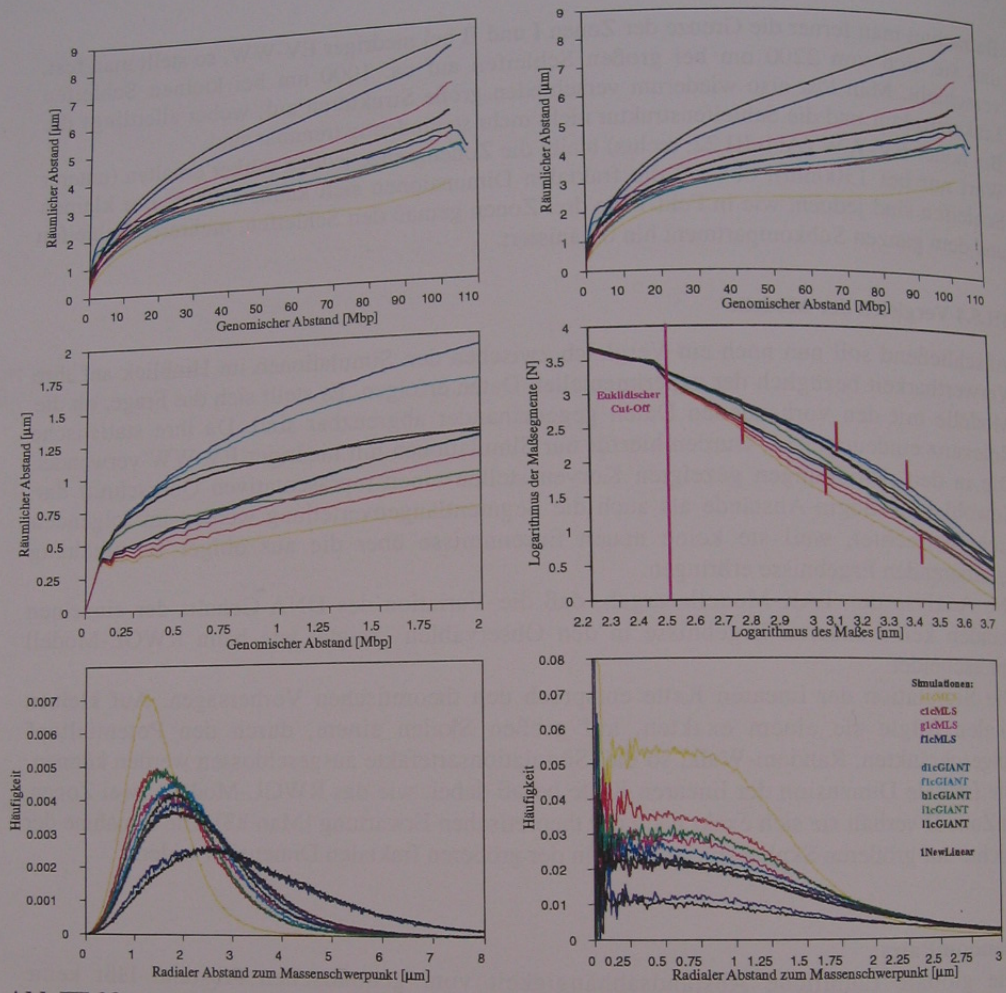


Abb.III.23:

Vergleich der verschiedenen Modelle. RandomPairs, oben rechts und links, sowie mitte links; Fraktale Dimension, mitte rechts; Aufenthaltswahrscheinlichkeit, unten links; Dichte, unten rechts.

Fraktale Dimension:

Mit der fraktalen Dimension ist eine Unterscheidung zwischen den Modellen über den gesamten genomischen Skalenbereich möglich. Dabei ist zu berücksichtigen, daß nicht nur der Wert der fraktalen Dimension von Bedeutung ist, sondern auch ihr Gültigkeitsintervall. Grundsätzlich stellt somit die fraktale Analyse die beste Differenzierungsmöglichkeit zwischen dem RWGL-Modell und dem MLS-Modell dar. Sie bietet weiterhin die Möglichkeit, direkt Aussagen über die Organisation und die Wechselwirkungen in einem Chromosomen-Territorium zu machen. Andere Observable lassen dies nicht oder nur im Zusammenspiel mehrerer Observablen zu.

IV Experimente

Ziel des experimentellen Teils war es, dreidimensionale räumliche Abstände zwischen fluoreszent markierten DNA-Sequenzen zu bestimmen. Mit diesen Werten wurde im Vergleich mit den Simulationen versucht, zwischen dem RWGL- und dem MLS-Modell zu unterscheiden. Die genomischen Abstände dieser Sequenzen sollten dabei weit unterhalb von 1Mbp liegen. Die Aufnahmen wurden mit einem neuen konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (CLSM) durchgeführt. Für die Markierung wurde die Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH) verwendet.
Mehrere hundert Zellkerne wurden aufgenommen, da bisher existierende Experimente nur unzureichende statistische Aussagekraft besitzen. Als genomische Region wurde die Prader-Labhart-Willi/Angelmann-Region (PLWS/AS) auf Chromosom 15 gewählt. Im Vergleich mit Simulationen sollte daraus die Faltungsstruktur der PLWS/AS-Region bestimmt werden.

IV.1 Experimentelle Methoden

Wie schon in Kapitel II erwähnt wurde, scheiterte die Aufklärung der Organisation von Chromosomenterritorien bisher hauptsächlich daran, daß bildgebende Verfahren mit hoher Auflösung strukturzerstörende Präparationsschritte benötigen. Die größten Fortschritte der letzten Jahre auf dem Gebiet der Chromosomenorganisation wurden durch die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie in Zusammenspiel mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung gewonnen.

IV.1.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die in-situ-Hybridisierung ist eine Methode, mit der man spezifisch DNA-Einzelstrangsequenzen markieren kann. Hierzu werden kurze Einzelstrangsequenzen benützt, die ihr komplementäres Gegenstück finden und sich daran anlagern. Die in-situ-Hybridisierung eröffnet dadurch die Möglichkeit, mit Nukleinsäuresonden spezifische Sequenzen in Geweben, Zellen, Zellkernen oder Chromosomen sichtbar zu machen. Die ersten in-situ-Hybridisierungen wurden von J. G. Gall und M. L. Pardue [GaPa 69] sowie H. A. John [Jo 69] zum Nachweis von rDNA-Sequenzen in cytologischen Präparaten mit radioaktiv markierten RNA-Sonden durchgeführt. Die erste erfolgreiche in situ-Hybridisierung einer Einzelkopiesequenz gelang Harper und Saunders [HaSa 81], die mittels radioaktiv markierter Sonden das menschliche Insulingen auf Chromosom 1 nachwiesen.
Eine Hybridisierung umfaßt fünf verschiedene Arbeitskomplexe:
Herstellung des biologischen Präparats, Gewinnung sowie Markierung der Sonde, Hybridisierung, sowie Detektion und Darstellung durch mikroskopische Verfahren. Während in diesem Abschnitt auf die ersten drei Punkte näher eingegangen wird, werden die letzten beiden in Abs. IV.2 und IV.4 beschrieben.

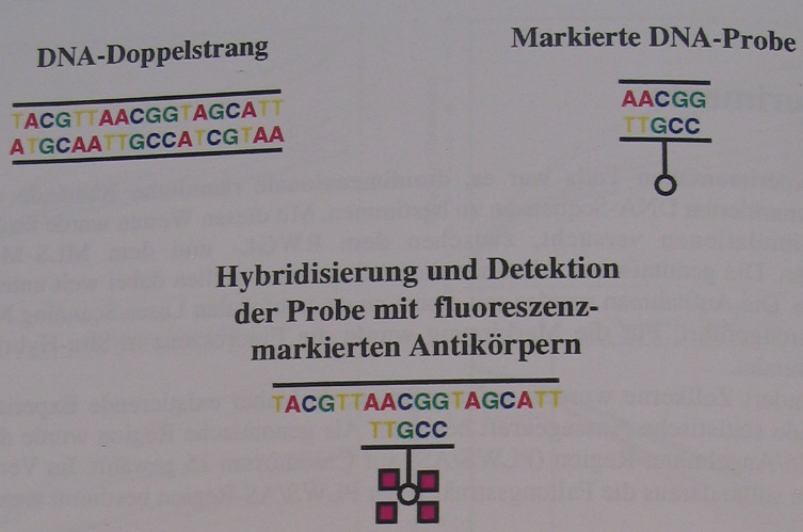


Abb.IV.1:
Schema der Hybridisierung: Ein DNA-Doppelstrang besitzt eine bestimmte Nukleotid-Sequenz. Eine markierte DNA-Sonde besitzt eine komplementäre Sequenz. Nach Denaturieren des Doppelstranges und der Sonde kann diese ihr komplementäres Gegenstück finden. Beide bilden dann ein Hybrid.

Fixierung:
Der Erfolg einer in-situ-Hybridisierung hängt von einer möglichst guten Konservierung der räumlichen Lagebeziehung der Zellkomponenten ab. Die Fixierung begrenzt dabei nicht nur den Verlust von Struktur, sondern muß das konservierte Gewebe auch für die Sonde und die Nachweisreagentien genügend permeabel lassen. Je höher der Grad der Fixierung, desto undurchlässiger ist das Gewebe. Die Wahl des Fixiermittels hängt von den Zellinien, von der Sonde, von dem für den Nachweis der Hybridisierung bildgebenden Verfahren und der gewünschten Sensitivität ab. Im allgemeinen unterscheidet man zwei Systeme von Fixiermitteln, wobei die erstere die Präparate quervernetzt (Glutaralaldehyd, Formaldehyd) und die zweite Proteine ausfällt (Ethanol oder Methanol). Die erste Fixierungsmethode führt oft zu geringerer Permeabilität, die dann durch zusätzliche Schritte erhöht werden muß.Die in dieser Arbeit verwendeten Fixierungsprotokolle sind in Abb.IV.2 niedergelegt.

Gewinnung und Herstellung der Sonden:
DNA-Sequenzen weist man gewöhnlich mit markierten DNA-Sonden nach, deren optimale Länge zwischen 100 und 600 Basenpaaren beträgt. Diese dringen gut in das Gewebe ein und finden ihre Zielsequenz mit ausreichender Spezifität. Für die Markierung der Sonden werden normalerweise radioaktiv (^{32}P, ^{35}S, ^{125}I, ^{3}H) oder nichtradioaktiv (Biotin, Digoxigenin, Sulfongruppen, Quecksilber etc.) markierte Nucleotide verwendet. Biotin und Digoxigenin wurden in dieser Arbeit verwendet: Biotin (Vitamin H) wurde als erste nichtradioaktive Markierung in Form von Biotin-11-dUTP verwendet. Alle Nukleotide sind an einer Position modifiziert, die die Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen Sonde und Zielsequenz nicht stört. Da die Base und die Markierung durch 11 Kohlenstoffatome getrennt sind, treten dabei keine sterischen Behinderungen auf. Digoxigenin ist ein pflanzliches Steroid aus Digitalis purpura (Fingerhut) und ist ebenfalls als Digoxigenin-11-dUTP etc. erhältlich.

Fixierung der Zellen - 2D Präparation:
1) Lösen der Zellen in der Kulturflasche mit 0,05% Tripsin in Phosphat Buffered Saline (PBS) (5min). Zellen in 50ml Röhrchen sammeln.
2) Zellen 10 min abzentrifugieren bei 1100 bis 1300 U/min.
3) Hypertoniebehandlung mit 10ml 0.55% KCl und 1% NaCitrat für 10 min bei 37°C.
4) Zellen 10 min abzentrifugieren bei 1100 bis 1300 U/min.
5) 3*Fixierung mit Methanoleisessig (3:1 in PBS), waschen und zentrifugieren.
6) Pepsinverdau: 50µg/ml in 0.01M HCl (pH 2,3) (99ml H_2O+1ml 1M HCl + 50 µl Pepsin) vorgewärmt auf 37°C für 10min bei 37°C.
7) Auftropfen der Zellen auf die Objektträger, wobei das Zytoplasma verlorengeht.

Fixierung der Zellen - 3D Präparation:
1) 3 * Waschen in PBS.
2) Fixierung in 4% Paraformaldehyd (frisch, 4g in 100ml PBS,pH 7,0) für 10min.
3) Waschen in PBS 3 * 3 min.
4) Membranpermeabilität: 0.5% Saponin + 0.5% TritonX-100 für 20min.
5) Einlegen in 20% Glycerin (20ml auf 80ml PBS) für 30min.
6) Langsam in flüssigen Stickstoff tauchen, auftauen lassen und zurück zum Schritt 5).
5) Wiederholung 5 mal.
7) Waschen in PBS 2 * 5min.
8) Objekträger in Formaldehyd inkubieren für 1h.

Abb.IV.2:
Fixierungsprotokolle für die 2D Präparation und die 3DPräparation

Die Sonden in dieser Arbeit wurden mit Nick-Translation markiert. Die Enzyme DNaseI und die DNA-Polymerase aus Escherichia coli wurden zum Einbau der markierten Nucleotide in beide Stränge der DNA Doppelhelix verwendet.
Die DNaseI führt dabei Einzelstrangbrüche in die doppelsträngige DNA ein. Durch die Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase werden Nukleotide in 3` Richtung vom Einzelstrangbruch entfernt und am anderen Ende die markierten Nukleotide eingebaut. Enthält die DNA zu wenig Einzelstrangbrüche, werden die Sondenfragmente zu lang und nicht ausreichend markiert; führt die DNaseI dagegen zu viele Brüche ein, geraten die Sondenfragmente zu kurz.

Denaturierung der DNA und Hybridisierung:
Bei der DNA:DNA-in-situ-Hybridisierung werden die Sonde und die Zielsequenz denaturiert. Danach findet die Sonde ihr komplementäres Gegenstück, die Zielsequenz, bildet mit ihr einen Doppelstrang und hybridisiert. Die Stabilität der Hybride hängt vom GC-Gehalt, der Länge des Nukleinsäurehybrids, seiner Umgebung und von Basenfehlpaarungen ab. Die Sonden befinden sich in einer Hybridisierungslösung, die Formamid, gelöste Salze, Dextransulfat, Blockade-DNA, Natriumdodecylsufat (SDS) oder Rinderserumalbumin (BSA) enthält. Formamid sorgt dafür, daß die Reaktion bei einer Temperatur stattfinden kann, die die Gewebestruktur nicht schädigt.Das in dieser Arbeit verwendete Hybridisierungsprotokoll befindet sich in Abb.IV.3.

Hybridisierung:
1) RNase(A)-Behandlung:
---Arbeitslösung (100µg/ml in 2 * Salt Sodium Citrate (SSC)) 200µl pro Objekträger für 1h bei 37°C, anschließend waschen: 3 * 5min
2) Pepsin-Verdauung:
--- 50µg/ml in 0.01M HCl (pH 2,3) (99ml H_2O+1ml 1M HCl + 50 µl Pepsin) vorgewärmt auf 37°C für 10min bei 37°C.
--- Waschen in PBS für 2 * 5min und waschen in PBS+$MgCl_2$ für 1 * 5min.
Postfixierung in 1% Formaldehyd (100ml PBS + $MgCl_2$ + 2,7ml 37% Formaldehyd) für 10min.
--- Waschen in PBS für 1 * 5min und anschließend in 70%, 90% und 100% Ethanol einlegen.

Chromatin-Denaturierung:
1) 2min in 70% Formamid/SSC (auf 70°C vorgewärmt), dann jeweils 3min in eiskalte Ethanollösung (zunächst 70%, dann 90% und 100%) und schließlich trocknen lassen.

DNA-Proben-Denaturierung:
Zunächst bei 37°C für 20-30min vorwärmen, dann 5min bei 75°C denaturieren.

Detektion:
1) Herstellen von 1l 4 * SSC mit 0.2% Tween (SSCT): 200ml 20*SSC + 800ml H_20 + 2ml Tween-20.
2) Objekträger in SSCT + 3% BSA für 20min bei 37° C abblocken.
3) Der erste Wechsel:
100µl Fluorescein-Avidin DCS (1:200in SSCT) und Mouse-anti-Digoxigenin (1:500 in SSCT) für 45min bei 37°C. Waschen in SSCT für 3 * 5min (Schüttler).
4) Der zweite Wechsel:
100µl biotinyliertes anti-Avidin D (goat, 1:200 in SSCT) und Schaf-anti-Maus-CY3 (1:500 in SSCT) für 45min bei 37°C. Waschen in SSCT für 3 * 5min (Schüttler).
5) Der dritte Wechsel:
100µl Fluorescein-Avidin DCS (1:200 in SSCT) für 45min bei 37°C. Waschen in SSCT für 3 * 5min (Schüttler).
6) DNA-Färbung: 50ml of SSCT +2,5µl DAPI-Lsg. (1mg/ml) für 3min.

Abb.IV.3: Das verwendete Hybridisierungsprotokoll, DNA- und Chromatin Denaturierung, sowie ein Beispiel für die Detektion.

Detektion der Hybridisierungsstelle:
Im Anschluß an die Hybridisierung der Sonde müssen die Hybridisierungsstellen nachgewiesen werden. Für den Nachweis nichtradioaktiv markierter Sonden nutzt man normalerweise die Immunogenität der Markermoleküle aus. Die Markermoleküle lassen sich mit Antikörpern (z. B. Anti-Digoxigenin) nachweisen. Biotin läßt sich entweder durch Anti-Biotin-Antikörper oder mit Avidin (ein Glykoprotein aus Hühnereiweiß mit sehr hoher Affinität zu Biotin, $K_a = 10^{15} M^{-1}$) oder Streptavidin nachweisen. Eine Detektion der Antikörper mit weiteren Antikörpern führt zu einer Verstärkung des Meßsignals. An die Antikörper sind Moleküle gebunden, die detektiert werden können. Hierzu können Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden. Eine Liste gängiger Fluoreszenzfarbstoffe befindet sich in Tab.IV.1.

Fluoreszenzfarbstoff	Anregungs-maximum [nm]	Emissions-maximum [nm]	Farbe der Fluoreszenz
a) Fluorophor			
Coumarin-AMCA	350	450	blau
Fluorescein Isothiocyanat (FITC)	495	515	grün
R-Phycoerythrin	525	575	rot
Rhodamin	550	575	rot
Tetramethylrhodamin Isothiocynat (TRIC)	575	600	rot
Texas Red	595	615	rot
Ultralight$_{680}$	rot	680	dunkelrot
CY3			rot
CY5	648	650	dunkelrot
b) DNA-Gegenfärbung			
Chromomycin A3	430	570	gelb
DAPI	355	450	blau
Hoechst 33258	356	465	blau
Propidiumiodid	340, 530	615	rot

Tab.IV.1:
Zur Detektion eingesetzte Fluoreszenzfarbstoffe und ihre spektralen Eigenschaften.

IV.1.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Die konventionelle Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie wird oft durch verschwommene Bildbereiche beeinträchtigt, die durch unscharfe Abbildungen von Strukturen, die sich nicht in der Brennebene befinden, entstehen. Marvin Minsky entwickelte 1957 [Mi 57] das konfokale (Laser-) Scanning-Mikroskop (CLSM), um die Auflösung zu verbessern.
Konfokal bedeutet, daß das Bild des Beleuchtungspunktes mit dem Detektionspunkt im Objektraum so zusammenfällt, daß sich beide in der Fokalebene überlagern (Abb.IV.4). Eine größere Auflösung in z-Richtung wird durch die Punktförmigkeit der Beleuchtung und der Detektion mit einer Blende erreicht. Im Gegensatz zum Epifluoreszenzmikroskop muß der Fokuspunkt aber das Objekt abtasten (scannen). Die Anregungsstrahlung fällt im Fluoreszenzbetrieb durch die Gesamtprobe. Dadurch werden stets auch Fluoreszenzmoleküle angeregt, die ober- oder unterhalb des Focus liegen. Das Mikroskopobjektiv erfaßt auch diese Bereiche. Ihr Beitrag am detektierten Signal wird proportional zum Abstand von der Fokalebene durch die Blende unterdrückt. Als Detektoren werden hochempfindliche Photomultiplier verwendet, die noch geringe Photonenintensitäten messen können. Durch die Verringerung der Anregungsintensität läßt sich das Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe stark reduzieren.
Für die Intensität einer Punktlichtquelle eines konventionellen Fluoreszenzmikroskops gilt [Wil89, WiCa 88]:

$$I_{konventionell}(v) = \left(\frac{2J_1(v)}{v}\right)^2, \qquad \text{(IV.1)}$$

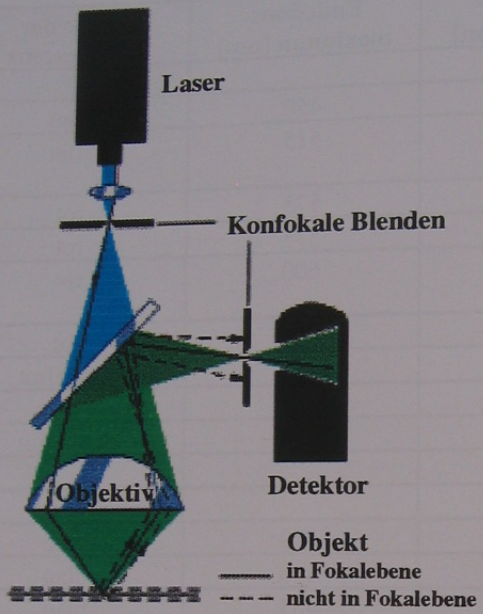


Abb.IV.4:
Prinzip des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops:
Ein Laserstrahl wird durch einen dichroitischen Spiegel und ein Objektiv auf die Probe fokussiert. Das von der Probe ausgehende Signal wird durch dasselbe Objektiv und den Spiegel auf den Detektor geleitet.
Im Fokus wird dabei nur ein kleines Volumen beleuchtet und detektiert, das Anregungs- und Detektionssignal wird durch eine konfokale Blende geführt.

wobei $J_1(v)$ die Besselfunktion erster Ordnung der normierten optischen Einheit v ist, die sich wie folgt darstellt:

$$v = \frac{2\pi}{\lambda} \cdot r \cdot \sin(\alpha), \qquad \text{(IV.2)}$$

mit der Wellenlänge λ, dem Radius r des Unschärfekreises im Objektraum und dem halben Öffnungswinkel α. Für ein CLSM ergibt sich für die Intensität

$$I_{konfokal}(v) = \left(\frac{2J_1(v)}{v} \right)^4, \qquad \text{(IV.3)}$$

d.h. die Intensität fällt mit der vierten Potenz des Abstandes ab. Die Auflösung ist damit um ca. 25% besser im Vergleich zu einem konventionellen Mikroskop [Ste 86].

IV.1.3 Das konfokale Mikroskop Leica TCS NT

Für die in dieser Arbeit gemachten konfokalen Aufnahmen wurde das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop TCS NT der Firma Leica verwendet. In Abb.IV.5 ist zunächst der gesamte Mikroskopaufbau zu sehen: Auf einem gedämpften Granittisch steht das Mikroskop mit dem Objektträgertisch im Zentrum. Darüber befindet sich der Objektivrevolver. Neben den seitlich angebrachten Quecksilberdampflampen für den Durchlichtbetrieb befindet sich auf dem Mikroskopfuß die Scannereinrichtung. Auf dem Tisch rechts befinden sich neben den Monitoren für die Aufnahmekontrolle ein manuelles Steuerpult für Mikroskopparameter. Ein PC steuert die Aufnahmen. Für die Anregung wird ein Argon-Ionenlaser benutzt.

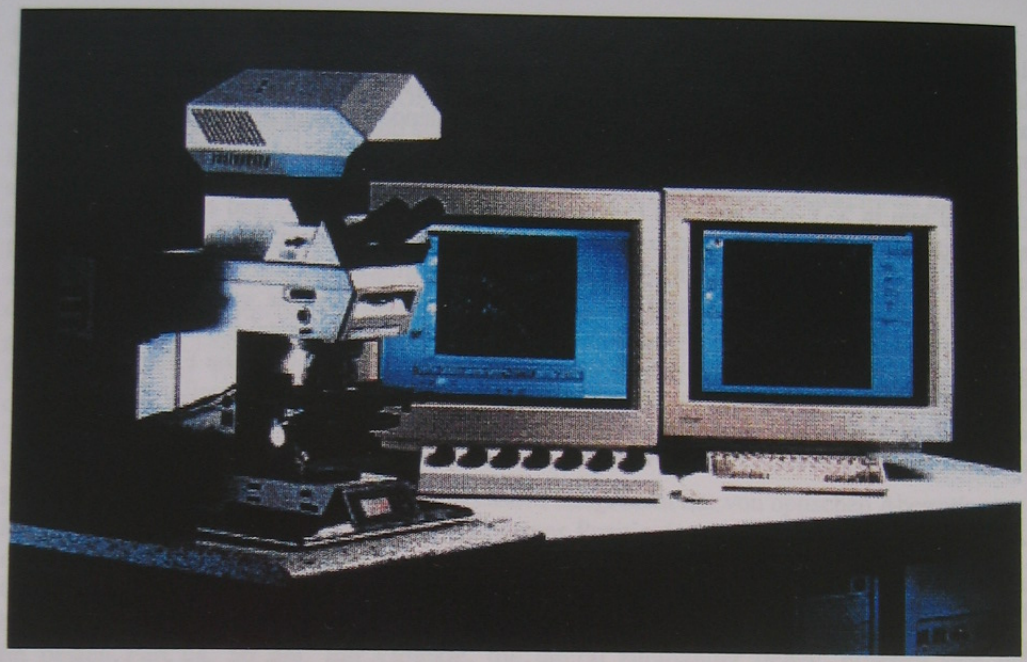


Abb.IV.5:
Aufbau des Leica TCS NT (mit freundlicher Genehmigung der Firma Leica).

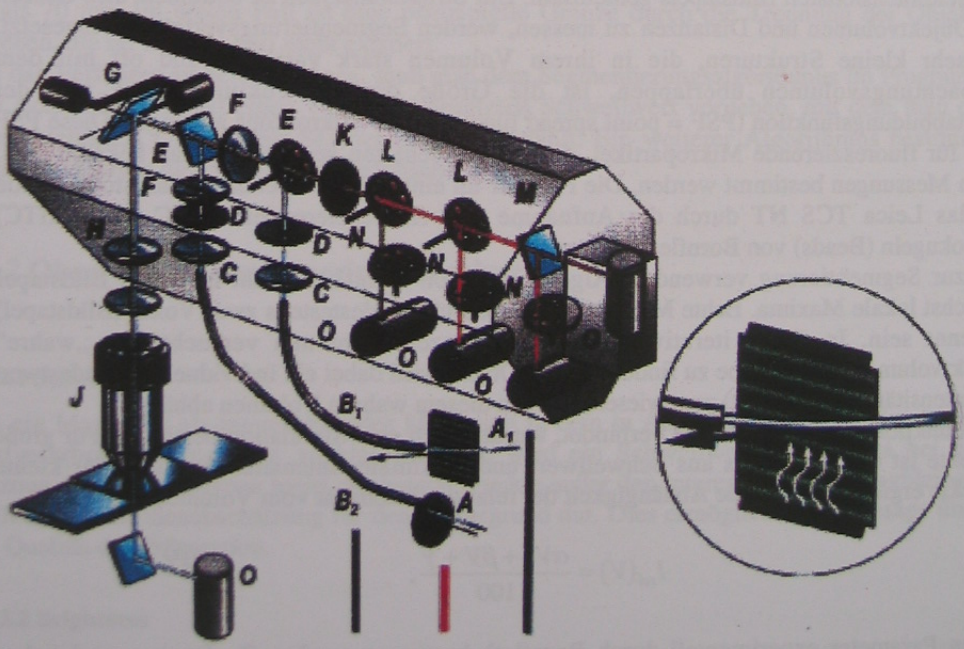


Abb.IV.6:
Aufbau des Scannerkopfes des Leica TCS NT (mit freundlicher Genehmigung der Firma Leica).

In Abbildung IV.6 wird der Scannerkopf erläutert: Das Laserlicht wird von einem auf dem Filterrad (A) befindlichen Filter oder von akustooptischen Filtern (A_1) durch eine Glasfaseroptik (B_1, bzw. B_2 für UV-Licht) in das System eingekoppelt und auf die Anregungsblende (D) (Pinhole) fokussiert. Der von der Blende kommende Lichtstrahl wird in Linse (E) parallelisiert und danach von einem dichroitischen Spiegel auf dem Filterrad (E) reflektiert. Ein einzelner Spiegel (G), der durch zwei Galvanometer betrieben wird, läßt den Lichtstrahl nun in X-Y-Richtung das Präparat abtasten. Eine Linse (H) und ein Objektiv (J) erzeugen die punktförmige Beleuchtung des Präparates. Das von dem Präparat ausgehende Fluoreszenzlicht wird vom Anregungslicht durch den dichroitischen Spiegel getrennt und über dieselbe Optik wieder auf Filterrad (E) gelenkt, von wo es auf die variable konfokale Detektionsblende (K) fokussiert wird. Danach lenken dichroitische Spiegel (L) den Lichtstrahl separat in die ausgewählten Emissionsbänder auf die Photomultiplier (O). Die Filterräder (N) nehmen eine weitere Filterung des Signals vor. Einerseits soll laut Hersteller durch das kompakte Design die Lebensdauer, durch die Trennung der einzelnen Komponenten jedoch die Flexibilität des Scannerkopfes erhöht werden.

IV.1.4 Bildverarbeitung

Für die Präzisionsdistanzmessung und die volumenerhaltende Segmentation von Objekten nahe oder unterhalb der Auflösungsgrenze werden bei der CLSM Bildverarbeitungsalgorithmen benötigt.. Die in dieser Arbeit verwendeten Bildverarbeitungsmethoden wurden von Bornfleth [Bor 98] speziell für diese Anwendung entwickelt. Sie sollen im folgenden kurz vorgestellt werden.

Fast allen Bildverarbeitungsmethoden ist eine Rauschfilterung (hier eine Median-Filterung) des dreidimensionalen Bildstapels gemeinsam. Um Strukturanalysen zu betreiben, also Größen wie Objektvolumen und Distanzen zu messen, werden Segmentierungsverfahren eingesetzt. Für sehr kleine Strukturen, die in ihrem Volumen stark variieren und oft mit dem Beobachtungsvolumen überlappen, ist die Größe dieser Strukturen stark von der Punktabbildungsfunktion (PSF = point spread function) des Mikroskops abhängig. Diese PSF kann für fluoreszierende Mikropartikel, deren Eigenschaften genügend genau bekannt sind, durch Messungen bestimmt werden. Die PSF der im einzelnen verwendeten Farbstoffe wurde für das Leica TCS NT durch die Aufnahme von fluoreszierenden (FITC und TRITC) Mikrokugeln (Beads) von Bornfleth gemessen.

Der zur Segmentierung verwendete Algorithmus von Bornfleth sucht in einem Bildstapel zunächst lokale Maxima. Echte Maxima müssen durch mindestestens zwei Voxel (Bildstapel) getrennt sein. In einem iterativen Wachstumsprozess wird nun versucht, das „wahre" Objektvolumen in der Probe zu finden. Jedem Objekt wird dabei ein individueller Mindestwert der Intensität (Schwellwert) zugewiesen, der von diesem wahren Volumen abhängt.

Die Funktion, die beide Größen verbindet, wurde durch eine Simulation bestimmt. Für große Objekte ist das Verhältnis aus Schwellwert und maximaler Intensität konstant. Für kleine Objekte ergibt sich folgende Abhängigkeit der relativen Intensität vom Volumen

$$I_{rel}(V) = \frac{\alpha V^2 + \beta V + \gamma}{100}, \qquad \text{(IV.4)}$$

deren Parameter experimentell durch Bornfleth bestimmt wurden. Zu Beginn wird jedem Objekt ein Schwellwert von 82% vorgegeben, der iteriert wird.

Das Objekt wächst nach folgenden Regeln: Ein Voxel gehört zum Objekt, wenn seine Intensität größer oder gleich dem Schwellwert ist, das nächste Voxel auf der Verbindungslinie zum Objektmittelpunkt bereits zum Objekt gehört, die Intensität dieses nächsten Voxels größer oder gleich dem Schwellwert ist und schließlich das Voxel nicht bereits einem anderen Objekt im selben Farbkanal angehört. Aus dem sich daraus ergebenden neuen Volumen ergibt sich ein neuer Schwellwert und das Verfahren wird wiederholt, bis der „wahre" Schwellwert gefunden ist.
Darüberhinaus kann nach der Bestimmung der Schrittweite des Mikroskops (x,y = 78nm und z = 200 nm) der Massenschwerpunkt eines Objektes bestimmt und die Distanz zwischen zwei Objekten berechnet werden. Für Objekte, die in unterschiedlicher spektraler Signatur markiert sind, lassen sich Distanzen bestimmen, die kleiner sind als die abbésche Auflösungsgrenze. Unterschiedliche Wellenlängen werden dabei nicht auf denselben Bildpunkt abgebildet chromatischer Shift). Die Farbkanäle müssen damit korrigiert werden. Zwischen FITC und TRITC wurde ein axialer Shift $\Delta c_z = 214$nm gemessen, während der Shift zwischen TRITC und CY5 zu vernachlässigen ist.
Der Fehler bei Distanzmessungen in einem CLSM hängt nicht nur von optischen Aberrationen, Photonenanzahl, Detektorrauschen und ungenauer Positionierung des Scanners ab, sondern auch vom Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes während der Messung. Die Genauigkeit der Objektpositionierung kann durch Messungen mit fluoreszenz-markierten Quarzpartickeln bestimmt werden [Bo98]. Der größte anzunehmende Fehler beträgt in axialer Richtung 85 nm, im besten Fall ca. 50 nm. Für Objekte, die lateral zueinander liegen, ergeben sich im schlechtesten Fall 31nm und im besten Fall 15 nm. Für die Genauigkeit dreidimensionaler Distanzmessungen für Objekte mit gleicher spektraler Signatur erhält man einen Wert unter 60nm. Für Objekte verschiedener spektraler Signatur ergibt sich eine Genauigkeit, die kleiner ist als 70 nm. Im ersten Fall ist eine prinzipielle Grenze durch die Trennung der Objekte gegeben, die im zweiten Fall nicht existiert.
Um das Verfahren zu beschleunigen, muß man dem Segmentierungsalgorithmus im Programm von Bornfleth zunächst einen von Hand gesetzten Schwellwert vorgeben, mit dem man die interessierenden Objekte zur Segmentierung auswählt. Ein weiterer Algorithmus bestimmt dann automatisch die Distanzen der nächsten Nachbarn.

IV.2 Observablen der Experimentanalyse

IV.2.1 Schwellwert

Um ein Maximum als interessierendes Maximum in dem in Abschnitt IV.1.4 beschriebenen Bildverarbeitungsprogramm zu klassifizieren, wird ein Schwellwert gesetzt. Da bei der Setzung des Schwellwertes meist nur wenige Punkte außer den interessierenden übrigbleiben, stellt er eine Größenabschätzung für den Hintergrund dar. Dies ermöglicht eine Aussage über die Qualität der Präparation.

IV.2.2 Brightness

Die Brightness stellt ein Maß für die Summe aller emittierten Photonen über alle Voxel eines Signals dar. Sie gibt also Auskunft über die absolute Emission eines Signals.

IV.2.3 Signalvolumen

Das Signalvolumen ist ein Maß für die Ausdehnung eines Signals. Dieses ist aber nur relativ zum Bildverarbeitungsalgorithmus bestimmt. Das Volumen hängt von der Ausdehnung des Klones, der Bindungsstärke Target-Probe, der für die Detektion verwendeten Anzahl von Antikörpern und Antikörperlagen ab. Diese Effekte können auch gleichzeitig auftreten und eine Trennung nur schwer ermöglichen, ohne andere Observable zu berücksichtigen.

IV.2.4 Integrierte Fluoreszenz Intensität (IFI)

Die IFI ist das Produkt aus Brightness und Volumen eines Signals und macht somit eine Aussage über die emittierte Photonenzahl pro Volumeneinheit. Sie enthält die Information über die Effizienz der Fluorochrome in Abhängigkeit der Präparation und ihrer lokalen Umgebung.

IV.2.5 Distanzen zwischen genetischen Markern

Um Abstände innerhalb eines Chromosoms zu messen, markiert man mindestens zwei Stellen auf einem Chromosom. Bestenfalls erhält man vier Signale mit zwei räumlichen Abständen auf je einem der beiden homologen Chromosomen. Lassen sich zwei Signale nicht mehr trennen, ist im allgemeinen das Volumen größer, da die Signale dann 100% deckungsgleich sind.
In einem Kern kommt immer ein kleinerer und ein größerer Abstand vor. Man kann für die beiden Abstände getrennte Verteilungen erstellen. Sofern die Mittelwerte signifikant verschieden sind, läßt dies Rückschlüsse auf die Struktur der homologen Chromosomen zu. Der signifikante Unterschied ist dabei nicht auf Sortiereffekte zurückzuführen [Ku96, Arif Esa -unveröffentlicht]:
Wählt man aus einer Häufigkeitsverteilung von Abständen zufällig Abstandspaare aus, ist immer einer kleiner als der andere. Man könnte nun annehmen, daß bei der Sortierung der jeweils größeren und kleineren Distanzen zwei unterschiedliche Häufigkeitsverteilungen entstehen. Das Auswählen der Paare ist jedoch statistisch unabhängig, so daß es gleich wahrscheinlich ist, ein nahe beieinanderliegendes Paar oder ein weit auseinanderliegendes Paar zu wählen. Wo ein solches Paar liegt, ist ebenfalls gleichverteilt. Dies entspricht einer Aufspaltung einer Häufigkeitsverteilung in zwei Häufigkeitsverteilungen mit demselben Mittelwert.

IV.2.6 Distanz zwischen homologen Chromosomen

Liegen Markierungen auf beiden Chromosomen vor, so kann man den Abstand der zwei homologen Chromosomen im Zellkern bestimmen. Man kann hierbei den Abstand zwischen den Markerschwerpunkten verwenden, egal wo die Marker auf dem Chromosom liegen. Hieraus kann man feststellen, ob Chromosomen eine fixierte räumliche Orientierung zueinander besitzen oder nicht. Die Distanzverteilung der Chomosomen ist auch ein Maß für die Größenverteilung des Zellkerns.

IV.3 Experimentdurchführung

Zu Begin dieser Arbeit waren sowohl die Meßergebnisse von van den Engh [vdE 92], als auch diejenigen von Yokota [Yo95] bekannt. Dabei wurden jedoch normale Epifluoreszenzmikroskope benutzt, d. h. nur die zweidimensionale Projektion des dreidimensionalen Abstandes wurden gemessen. Da dreidimensionale Abstände durch diese Projektion um im Mittel 2/3 reduziert werden, sinkt die Distanzauflösung vor allem bei einfarbiger Detektion. Zwei Markierungen wurden nur dann als einzelne Punkte wahrgenommen, wenn sie einen Mindestabstand besaßen, der von der Spotgröße der Markierung abhängig war. Die Präparationsmethode hatte darüberhinaus den Nachteil, daß sie selbst strukturzerstörend wirkte (Abs.I.6 und [Yo 95]). Die Aufnahmen der Zellkerne wurden auf handelsüblichen photographischen Film gespeichert und die Distanzen dadurch bestimmt, daß die Negative auf ein Digitalisierungsboard mit ca. 10.000 facher Vergrößerung projiziert wurden. Von Hand wurden dann die Signalmittelpunkte bestimmt, deren Abstände von einem Computerprogramm berechnet wurden. Deshalb blieb unklar, wie sich räumliche Abstände für genomische Distanzen unter 500kbp verhalten würden und welches Modell für ein Chromosomenterritorium nun eigentlich anwendbar sei.

Um zwischen dem RWGL- und dem MLS-Modell zu unterscheiden, und um realistische experimentelle Ergebnisse zu erhalten, mußten bei den Experimenten verschiedene Parameter variiert werden.

- Es wurden sowohl isotonische, als auch hypertonische Präparationen durchgeführt.

- Es wurde gezeigt, daß die verwendeten Klone nicht nur innerhalb des Chromosomenterritoriums liegen. Die Klone selbst wurden dabei so klein wie möglich gewählt.
- Um Abstände messen zu können, die nahe oder unter der Auflösungsgrenze des Mikroskops lagen, wurden die Proben mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen detektiert. Bei Detektion desselben Targets mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen wurde die chromatische Verschiebung und die Lokalisationsgenauigkeit der Proben gemessen.

- Zur Verstärkung des Meßsignals wurden ein- und zweilagige Antikörperschichten zur Detektion benutzt, und die Abhängigkeit von Signalvolumen sowie die Integrierte Fluoreszenz Intensität (IFI) wurden untersucht.

- Es wurden genügend Zellkerne gemessen, um statistisch aussagekräftige Abstandsverteilungen zu erhalten, die adäquat mit den Simulationen verglichen werden können.

IV.3.1 Experimentansatz und Objektträgerpräparation

Experimentansatz und Präparation der Objekträger:
Während eines Aufenthaltes in München konnten unter Leitung von Irina Solovei die benötigten Objekträger hergestellt werden. Als Genregion für die Abstandsmessungen wurde die Prader-Willi-Labhard- bzw. Angelmann-Region auf Chromosom 15 gewählt. Die Herstellung der λ-Klone und ihre Charakterisierung wurden freundlicherweise von Dr. Karin Bütig und Prof. Dr. Horsthemke zur Verfügung gestellt. Für die Auswahl der Genregion war die Größe der Klone (Abb.IV.7) und der beschriebene medizinische Hintergrund maßgebend. Im folgenden sollen die einzelnen Objekträger beschrieben werden (Tab.IV.2):

Hypertonische (2D) Präparation:
Hypertonische Präparationen wurden durchgeführt, indem auf 5 Objektträgern 7 Hybridisierungen angesetzt wurden. Drei Objektträger (2D279, 2D280 und 2D281) wurden mit Y48 und Y60 hybridisiert. Damit sollten größere räumliche Distanzen gemessen und ein Anschluß an globales Chromosomenverhalten erzeugt werden. Objektträger 2D280 wurde weiterhin bei der Detektion mit einer doppelten Antikörperlage versehen, um eine Amplifizierung des Meßsignals zu untersuchen. Auf Objektträger 2D280 wurde einer der Klone difluoreszent markiert, um den chromatischen Shift zu bestimmen und die Klonlokalisation eindeutig festzustellen. 2D278A+B wurden gemäß 2D280 erstellt, allerdings unter Verwendung von λ-Klonen und einem Wechsel der Lokalisationsdetektion. Entsprechend wurde auch 2D277A+B, allerdings mit monofluoreszenter Detektion und dem Versuch der DAPI-Anfärbung zum besseren Auffinden eines Kerns angesetzt. Beide zuletzt genannten Objekträger wurden hauptsächlich auf das im Aufbau befindliche Wellenfeldmikroskop abgestimmt (Größe der λ-Klone).

Isotonische (3D) Präparation:
Zwei Objektträger wurden mit Y48 und Y60 hybridisiert. Durch ihre Größe sollten sie auf jeden Fall binden und detektierbar sein. Während 3D288 monofluoreszente Detektion aufweist, wurde in 3D289 nicht nur eine Detektions-Amplifizierung vorgenommen, sondern gleichzeitig noch der q-Arm von Chromosom 15 angefärbt. Als Kontrolle wurden auf 3D290 und 3D291 die Chromosomenarme von Chromosom 1 markiert. Schließlich wurden drei Paare von λ-Klonen präpariert, wobei die Markerpaare mit nur einem Farbstoff markiert wurden.
Somit hingen die Ergebnisse von der Präparationsmethode, den jeweiligen Klonen, der Detektion und vom verwendeten Fluoreszenzfarbstoff ab.

Bei der Durchführung der Präparation wurde die Fixierung aus Abb.IV.2 und die Hybridisierung und Detektion aus Abb.IV.3 durchgeführt. Als Zellen wurden menschliche Fibroblasten gewählt, die auf einem Objektträger wuchsen, bis sie ihn vollständig bedeckten. Dadurch wurde erreicht, daß sich alle Zellen im gleichen Zellstadium (G_0-Phase) befinden.

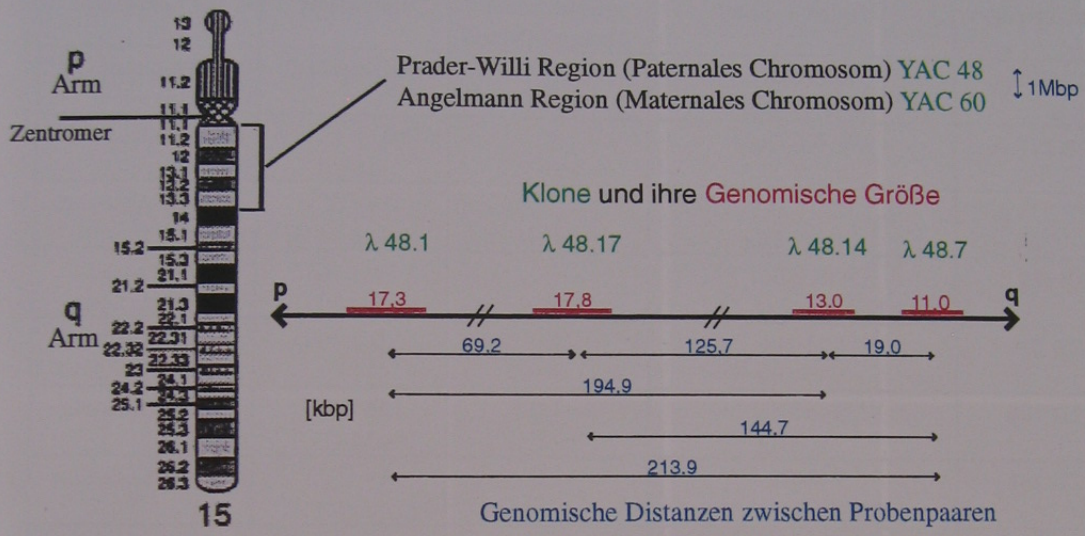


Abb.IV.7:

Die verwendeten Klone, ihre Größe und Lokalisation auf Chromosom 15.

IV.3.2 Durchführung der Mikroskopaufnahmen

Um Alterungseffekte und Beschädigungen der Objektträger zu vermeiden, wurde nach der Durchführung der Präparation sofort mit der Aufnahme von Zellkernen begonnen. Zunächst soll auf die gewählten Einstellungen des Mikroskops eingegangen werden, bevor die Ergebnisse der Durchführung genauer beschrieben werden:
Die Aufnahmen wurden im XY-Modus (Scan-Ebene in der Horizontalen) vorgenommen, da hierfür die entsprechenden Auflösungen optimal geeignet sind (lateral ca. 250 nm, Axial ca. 500 nm). Achtmal wurde über dieselbe Bildebene gemittelt, um Rauscheffekte zu unterdrücken.
Als Bildformat stellte sich bei vierfachem Zoom eine 512*512 Pixel-Matrix als sinnvoll heraus. Ein Bildstapel enthielt zwischen 8 und 25 Bildebenen. In Anbetracht der achtmaligen Mittelung ergaben sich hiermit keine allzu starken Ausbleicheffekte der Fluorochrome. Einmal aufgenommene Kerne hätten oft ein zweites Mal aufgenommen werden können, ohne mit einem nicht aufgenommenen Kern verwechselt zu werden. Die Voxelgröße ergab sich in lateraler Richtung zu 78nm und in axialer Richtung zu 200nm.
Die Spannungsversorgung der Photomultiplier wurde durch Probieren ermittelt. Sie betrug 767 V im grünen Kanal und 732 V im roten Kanal. Die konfokale Blende wurde auf den Wert 32 gesetzt, als Objektiv wurde ein 63* Leitz-Objektiv mit NA=1,4 verwendet. Die Laserleistung für die einzelnen Farbkanäle wurde für den roten auf 14% und für den grünen Kanal auf 20% der Gesamtlaserleistung eingestellt. Alle Bilder wurden dabei im GlowOverUnder-Modus aufgenommen, um etwaige Überbelichtungen feststellen zu können.

Objektträger	Gelabelte Klone	genomischer Abstand [Mbp]	Detektion	Ziel
2D 277 A	λ48.1-Dig λ48.17-Dig	0,069	SαDig-FITC	Hypertonie Wellenfeld
2D 277 B	λ48.1-Dig λ48.17-Dig	0,069	SαDig-FITC +DAPI	Hypertonie, DAPI, Wellenfeld
2D 278 A	λ48.1-Dig + λ48.1-Bio λ48.17-Dig	0,069	Av-CY3 SαDig-FITC	Klonlokalisation, Chrom. Shift
2D278 B	λ48.1-Bio λ48.17-Bio + λ48.17-Dig	0,069	Av-CY3 SαDig-FITC	Klonlokalisation, Chrom. Shift
2D 279	Y48-Dig Y60-Dig	1,0	SαDig-FITC	Monolage
2D 280	Y48-Dig Y60-Dig	1,0	MαDig + SαM-CY3	Amplifizierung
2D 281	Y48-Bio Y60-Bio + Y60-Dig	1,0	Av-CY3 SαDig-FITC	Klonlokalisation
3D 282	λ48.1-Dig λ48.14-Dig	0,018	SαDig-FITC	Monolage
3D 283	λ48.1-Dig λ48.14-Dig	0,018	MαDig + SαM-CY3	Amplifizierung
3D 284	λ48.1-Dig λ48.17-Dig	0,060	SαDig-FITC	Monolage
3D 285	λ48.1-Dig λ48.17-Dig	0,060	MαDig + SαM-CY3	Amplifizierung
3D 286	λ48.7-Dig λ48.17-Dig	0,194	SαDig-FITC	Monolage
3D 287	λ48.7-Dig λ48.17-Dig	0,194	MαDig + SαM-CY3	Amplifizierung
3D 288	Y48-Dig Y60-Dig	1,0	SαDig-FITC	Hypertonie
3D 289	Y48-Dig Y60-Dig 15q-Bio	1,0	MαDig + SαM-CY3 Av-FITC	Klonlokalisation auf Chromosom 15
3D 290	1p-Bio 1q-Dig	-	Av-CY3 SαDig-FITC	Armpainting 3D Kontrolle
3D 291	1p-Bio 1q-Dig	-	Ethanol Postfix Av-CY3 SαDig-FITC	Ethanol Postfix Kontrolle

Tab.IV.2:

Experimentansatz und hergestellte Objektträger.
MαDig: Maus Antikörper gegen Digoxigenin, Av-CY3: Avidin mit CY3 markiert, SαM-Cy3: Schafantikörper gegen den Mausantikörper mit CY3 markiert, SαDig-FITC: Schafantikörper gegen Digoxigenin, mit FITC markiert.

Der GlowOverUnder-Modus ist eine gängige Darstellung eines Bildpunktes, die anzeigt, wann ein Farbwert auf einer Skala von 0 bis 256 eine Helligkeit von 0 unter- oder von 256 überschreitet. Die Aufnahmen wurden in eine Glowdarstellung für die Bildverarbeitung umgewandelt.

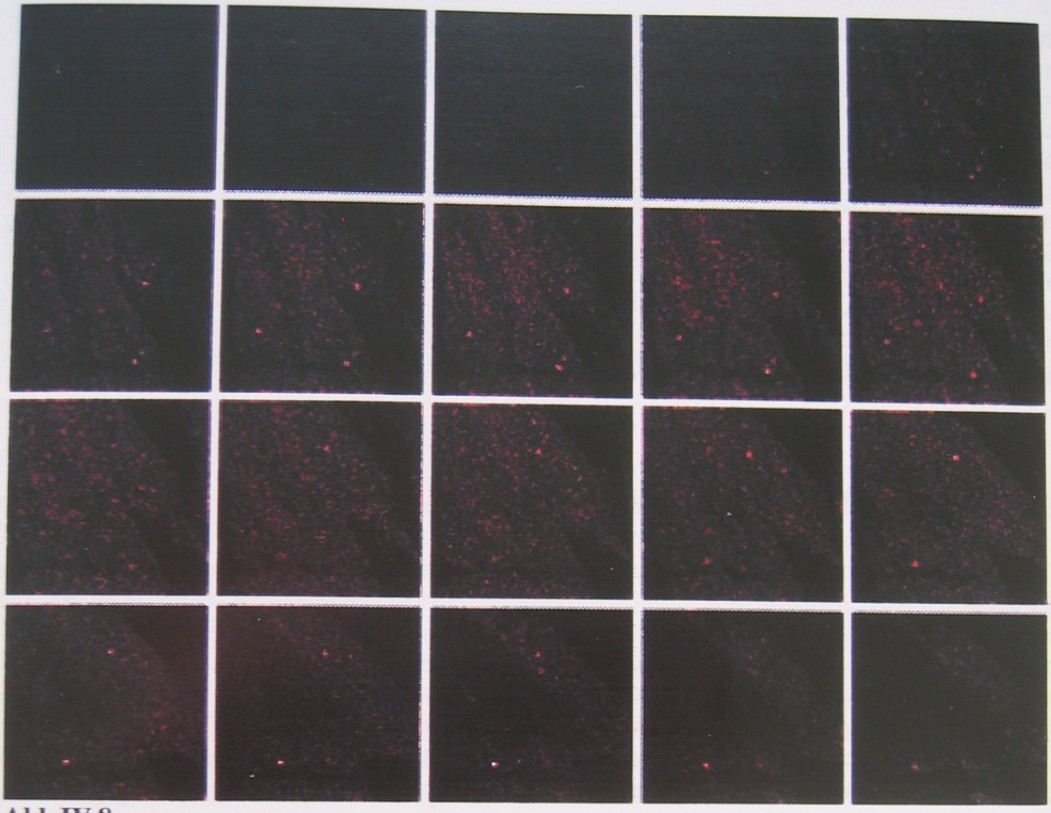


Abb.IV.8:
Schnittserie durch einen Kern von Objektträger 3D287. Genomischer Abstand: 18kbp

Abb.IV.9:
Projektion der Schnittserie von Abb.III.8 in eine Ebene (Extended Focus) nach der Medianfilterung.

Folgende Signale wurden registriert:

1: nur ein Spot.
2: zwei Spots, d = 135nm.

3: zwei Spots, d = 182nm.
4: zwei Spots, d = 424nm.

5: zwei Spots, d = 469nm.
6: nur ein Spot.

Glowdarstellung heißt, daß die obige Skala überschreitende Werte auf 0 oder 256 gesetzt werden. Wurden Überbelichtungen festgestellt, so wurde die Laserleistung reduziert und ein anderer Kern aufgenommen. Als Immersionsöl wurden diejenigen der Firmen Neolab und Zeiss verwendet.
Generell wurden die Kerne zunächst auf ihre Tauglichkeit hin durch ein normales Okular ausgewählt und im Zentrum des Gesichtsfeldes positioniert. Kerne wurden als tauglich bewertet, wenn sie 4 Signale zeigten oder sich vermuten ließ, daß man durch die Aufnahme oder die Bildverarbeitung zu diesem Ziel gelangt. Danach wurde mit Hilfe der Mikroskopsoftware der Kern weiter in das Zentrum des Scannerbildes verschoben. Dabei wurde eine Bildebene im Scanbetrieb ohne Mittelung und bei nur 3% Laserleistung aufgenommen (nicht im Dauerbetrieb!). Der Kern zeigte keinerlei Schädigungen oder frühzeitiges Ausbleichen der Fluorochrome.

IV.4 Ergebnisse der Experimentanalyse

Wie Tab.IV.4 zeigt, wurden insgesamt 1303 Bildstapel aufgenommen, die insgesamt 1661 Zellkerne enthielten. 166 Aufnahmen wurden von J. R., 1137 Aufnahmen von T. A. K. gemacht. Insgesamt wurden 212 Stunden für die gesamten Aufnahmen benötigt. Dies entsprach 6,2 Aufnahmen oder 7,8 Kernen pro Stunde. Rechnet man ca. 1,5 Stunden für die jeweilige Inbetriebnahme und das Brennen der CD ab, so erhält man mit 7,0 Aufnahmen oder 9,0 Kerne pro Stunde als Maß für die Leistungsfähigkeit des Mikroskopes. Die gesamte aufgenommene Informationsmenge betrug für alle Aufnahmen 7,7GByte.

Objekt-träger	Mikroskopaufnahmen				Immer-sionsöl	Bemerkung
	total [N]	Kerne [N]	JR [N]	TAK [N]		
2D 277 A	-	-	-	-	-	noch keine Messungen
2D 277 B	-	-	-	-	-	noch keine Messungen
2D 278 A	80	94	20	60	Zeiss	teilweise analysiert
2D278 B	70	72	-	70	Zeiss	teilweise analysiert
2D 279	187	207	35	152	Zeiss	analysiert
2D 280	133	156	51	82	Neolab	analysiert
2D 281	140	156	45	95	Neolab	fehlerhafte Abspeicherung
3D 283	123	166	-	123	Zeiss	teilweise analysiert
3D 285	122	180	-	122	Zeiss	teilweise analysiert
3D 287	122	199	-	122	Zeiss	noch nicht analysiert
3D 289	143	180	10	133	Zeiss	noch nicht analysiert
3D 290	125	174	5	120	Neolab	noch nicht analysiert
3D291	54	73	-	54	Zeiss	noch nicht analysiert
total	1303	1661	166	1137		

Tab.IV.3: Protokoll der Aufnahmen der präparierten Objektträger.

IV.4.1 Durchführung der Experimentanalyse

Nachdem die Kerne wie oben beschrieben aufgenommen waren, wurden die Bilder in das für die Bildverarbeitung benötigte Rohformat konvertiert, wobei auch die Median-Filterung erfolgte. Da die Bildverarbeitungsalgorithmen von Bornfleth nur für kleine Spots geeignet sind, wurden von den Armproben bisher nur diejenigen ins Rohformat konvertiert, in denen sich noch einzelne Spots befinden. Danach wurde der Schwellwert für jede Aufnahme und jeden Farbkanal einer Aufnahme einzeln von Hand bestimmt.
Bisher wurde dieses Verfahren auf die Objektträger 2D278A+B, 2D279, 2D280, 2D281, 3D283, 3D285, 3D287 und 3D289 angewendet. Dabei erfolgten ca. 1200 Schwellwertfestlegungen.Die benötigten Rechungen wurden auf der Silicon Graphics Iris der Arbeitsgruppe Angewandte Optik und Informationsverarbeitung durchgeführt.

IV.4.2 Analyse der Objektträger:

Bisher wurden die Objektträger 2D279 und 2D280 vollständig ausgewertet. Die Objektträger 2D278 A und B wurden bis auf Distanzmessungen ausgewertet. Die Distanzen müssen hierbei noch mit der chromatischen Verschiebung korrigiert werden. Für die Objektträger 3D283 und 3D285 liegen zwar die Daten schon vor, es konnten bisher aber nur die Distanzen analysiert werden. Leider lassen sich daher keine Aussagen über systematische Effekte bei Brightness, Volumen und IFI ziehen. Auch bei den Distanzen können Aussagen, die mit diesen Größen zusammenhängen, nur schwer gemacht werden. Bei Vorlage aller Daten des Screenings sollte dies jedoch möglich sein. Deshalb sollen in dieser Arbeit nur die Ergebnisse der Single- und Double-Spots (Nomenklatur siehe unten) besprochen werden. Die Ergebnisse von SP1 bis SP4 sollen dagegen nur in den Tabellen aufgezeigt werden.

Bevor die Ergebnisse besprochen werden, sollen einige Begrifflichkeiten erläutert werden:

In einem Kern können maximal 4 Signale registriert werden, wenn die Hybridisierung eines Markerpaares gelungen ist. Jeweils zwei Signale befinden sich dabei auf einem der homologen Chromosomen. Da dieser Optimalfall jedoch nicht immer eintritt, wurden die Kerne in 5 Klassen unterteilt: A = 2*2 Signale, B = 1*2 Signale und 1*1 Signal, C = 1* 2 Signale, D = 2*1 Signale und E = 1*1 Signal.
Während im Fall A und C immer eindeutig ist, daß ein Signal von einem Target herrührt, läßt sich dies im Falle von B nur für das eine Chromosom sagen. Für die einzelnen Signale aus Klasse B, D, E ist jedoch nicht klar, inwieweit ein Signal von einem oder von zwei nicht trennbaren Targets stammt. Diese Spots sollten also im Mittel größer sein, da sie Anteile aus beiden Gruppen besitzen.
Für das Analyseprotokoll wurden die Signale nach der Zugehörigkeit zu einem Chromosom und ihrer Größe nach sortiert. Der Signale mit der größten Brightness wurde dabei immer als SP1 bezeichnet, das dazugehörende zweite Signal als SP2. Ebenso wurde mit dem anderen Chromosom verfahren. Grundsätzlich gehören SP1 und SP2 zu einem und SP3 und SP4 zum anderen Chromosom. Aus der daraus folgenden Auflistung im Analyseprotokoll läßt sich im Zusammenhang mit der Klassifizierung immer erkennen, welche Eigenschaften ein Spot einer Aufnahme besitzt.
Spot SP1 besteht aus allen Klassen; SP2 nur aus Klasse A, B und C; SP3 nur aus Klasse A, B und D und SP4 nur aus Klasse A.

Die Distanzen wurden immer in Distanz 1 und Distanz 2 unterteilt, wobei Distanz 1 immer die größere ist.
In den hier angegebenen Tabellen IV.5 bis IV.10 sind sowohl die Mittelwerte der Observablen für die Signale SP1 bis SP4, als auch die Mittelwerte der eindeutig einzelnen (single), als auch der nicht eindeutigen einzelnen (double) Spots aufgeführt.

IV.4.3 Schwellwert

Der Schwellwert liegt zwischen 56 und 116,5 (Tab.IV.4). Werte von 56 bis 67 scheinen dabei vorherrschend zu sein. Eine weitergehende generelle Aussage erscheint jedoch bisher nicht möglich.

	Schwellwert				IFI Single				IFI Double			
	∅	±	σ	N	∅	±	σ	N	∅	±	σ	N
2D278Ag	86,8	6,3	20,8	11	170	14,7	55,0	14	269	44,2	132	11
2D278Ar	66,3	5,0	16,6	11	101	11,6	46,3	16	-	-	-	-
2D278Bg	56,0	1,3	11,3	71	137	5,4	59,8	122	-	-	-	-
2D278Br	67,7	1,8	15,0	71	118	5,5	47,7	73	188	9,1	85,1	88
2D279	116,5	7,1	81,2	129	529	21,1	340	260	698	54,0	458	72
2D280	57,4	1,5	18,1	143	249	8,5	154	320	318	17,9	152	72

Tab.IV.4:
Ergebnisse der Schwellwert- und IFI-Anlyse verschiedener Objektträger und Signale.

	Brightness Single				Brightness Double				Volumen Single				Volumen Double			
	∅	±	σ	N	∅	±	σ	N	∅	±	σ	N	∅	±	σ	N
2D278Ag	21,2	4,0	15,1	14	17,3	3,1	10,2	11	12,7	2,6	10,0	14	19,3	5,8	19,2	11
2D278Ar	13,9	1,9	7,6	16	-	-	-	-	15,0	7,7	31,1	16	-	-	-	-
2D278Bg	17,8	1,2	13,3	122	-	-	-	-	12,7	1,3	14,4	122	-	-	-	-
2D278Br	21,5	1,7	14,4	73	24,6	1,6	15,1	88	7,8	0,8	6,8	73	14,9	2,5	23,2	88
2D279	11,4	0,7	11,3	262	8,3	0,6	5,4	76	80,6	4,1	80,6	262	67,2	8,7	73,9	72
2D280	17,7	2,8	53,0	320	4,29	0,7	5,8	72	108	4,1	73,6	320	137	8,6	72,9	72

Tab.IV.5:
Egebnisse der Brightness und des Volumens verschiedener Objektträger und Signale

	Brightness SP1				Brightness SP2				Brightness SP3				Brightness SP4			
	∅	±	σ	N	∅	±	σ	N	∅	±	σ	N	∅	±	σ	N
2D278Ag	19,9	4,6	15,5	11	22,8	6,2	15,2	6	16,8	3,3	7,3	5	-	-	-	-
2D278Ar	14,1	1,9	6,0	10	-	-	-	-	17,2	5,3	10,5	4	-	-	-	-
2D278Bg	19,7	1,6	13,3	67	-	-	-	-	14,6	1,6	11,3	53	-	-	-	-
2D278Br	23,2	1,7	14,2	69	23,5	2,9	23,5	33	22,5	1,9	14,6	58	25,3	3,6	10,9	9
2D279	14,5	1,1	13,1	129	7,2	0,8	7,8	105	10,2	0,7	6,9	97	11,7	2,7	1,7	43
2D280	6,2	0,7	8,5	143	2,6	0,28	3,1	116	5,0	0,6	5,9	94	2,5	2,4	0,34	48

Tab.IV.6:

Ergebnisse der Brightnessanalyse verschiedener Objekträger und Signale.

	Volumen SP1				Volumen SP2				Volumen SP3				Volumen SP4			
	∅	±	σ	N	∅	±	σ	N	∅	±	σ	N	∅	±	σ	N
2D278Ag	22,5	9,9	32,9	11	15,5	5,7	14,1	6	20,0	8,9	19,8	5	-	-	-	-
2D278Ar	8,00	1,2	3,65	10	-	-	-	-	5,75	1,1	2,2	4	-	-	-	-
2D278Bg	11.8	2,0	16,2	67	-	-	-	-	14,3	1,6	11,8	53	-	-	-	-
2D278Br	9,2	1,7	13,8	69	8,7	1,2	7,1	34	16,4	3,2	24,8	58	7,9	2,0	6,1	9
2D279	70,1	6,3	71,6	129	101,2	6,1	63,3	105	89,1	7,9	76,6	97	81,8	8,3	52,7	43
2D280	97	6,2	75	143	127	7,0	75	116	117	7,8	76	94	123	7,5	52	7,56

Tab.IV.7:

Ergebnisse der Volumenanalyse verschiedener Objekträger und Signale.

IV.4.4 Brightness

Die Brightness für ein Single-Signal beträgt zwischen 11,4 und 21,5 und für ein Double-Signal zwischen 4,3 und 17,9 (Tab.IV.5). Sie ist in fast allen Fällen kleiner als für ein Single-Signal. Auffällig ist, daß die Brightness dabei für alle Objektträger keine definitiven Unterschiede zwischen den YAC und Lambda-Klonen zeigt. Eine Erklärung kann hier nur die gleiche Mikroskopeinstellung und die gleiche Laserleistung, mit der die Aufnahmen gemacht wurden, liefern.

IV.5.5 Volumen

Beim Volumen zeigen sich große Unterschiede zwischen den Objektträgern. 2D278 A und B haben ein Volumen zwischen 7,8 und 15 für Single- und zwischen 14,9 und 19,3 für Double-Signale. 2D279 zeigt Werte von 80,6 und 67,2 und 2D280 zeigt Werte von 108 und 137. Hieraus ergibt sich, daß die YAC-Klone ein wesentlich größeres Volumen als die Lambda-Klone besitzen. Dies korreliert mit der Größe dieser Klone. Der Unterschied zwischen 2D279 und 2D280 ist auf die Amplifizierung des Meßsignals mit zwei Antikörperlagen zurückzuführen. Für ein Single-Signal beträgt sie 35% und für ein Double-Signal fast 100%. Der Zuwachs von 100% dürfte darauf zurückzuführen sein, daß hier der Anteil von Spots, die aus zwei nicht mehr trennbaren Klonen bestehen, wesentlich höher ist. Dies wird durch die Zahl der gemesssenen kleineren Distanzen 2 gestützt: Bei 2D279 sind dies 89 und bei 2D280 48, also praktisch nur noch die Hälfte. Generell gilt für alle Objektträger, daß das Volumen der

	IFI SP1				IFI SP2				IFI SP3				IFI SP4			
	∅	±	σ	N	∅	±	σ	N	∅	±	σ	N	∅	±	σ	N
2D278Ag	203	34,9	116	11	210	21,9	53,6	6	235	61,5	137	5	-	-	-	-
2D278Ar	97	5,8	18,3	10	-	-	-	-	82,1	6,3	12,6	4	-	-	-	-
2D278Bg	137	7,7	63,3	67	-	-	-	-	140	7,6	55,4	53	-	-	-	-
2D278Br	147	9,5	79,5	69	137	9,3	53,5	33	179	11,2	86,0	58	155	26,0	78,2	9
2D279	454	26,2	297	129	503	31,5	322	105	581	43,4	421	97	444	202	32	43
2D280	269	12,8	153	143	230	9,9	106	116	302	21,4	207	94	241	130	18	48

Tab.IV.8:
Ergebnisse der IFIsanalyse verschiedener Objekträger und Signale.

	Distanz Total [nm]				Distanz 1 [nm]				Distanz 2 [nm]				Distanz Chromosom [nm]			
	∅	±	σ	N	∅	±	σ	N	∅	±	σ	N	∅	±	σ	N
2D278A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2D278B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9558	502	4821	92
2D279	694	33,0	395	143	758	40,7	415	104	523	43,6	272	89	8558	489	3175	42
2D280	848	30,5	389	162	922	39,1	418	114	673	33,5	232	48	10226	517	4602	79
3D283	358	33,6	349	99	410	41.9	368	77	177	37,1	174	22	-	-	-	-
3D285	561	41.2	387	95	586	43,8	382	76	461	90,4	394	19	-	-	-	-

Tab.IV.9:
Ergebnisse der Abstandsanalyse verschiedener Objekträger und Signale.

Double-Signale größer ist, so daß die oben gemachte Vermutung aus den Signalklassen sicherlich zutreffend ist.

IV.4.6 Integrierte Fluoreszenz-Intensität (IFI)

Für die Integrierte Fluoreszenz-Intensität (IFI) gilt prinzipiell dasselbe wie für das Volumen (Tab.III.8). Für 2D278 A und B reichen die Werte von 101 bis 137 für ein Single- und von 188 bis 269 für ein Double-Signal. Für 2D279 betragen die Werte 529 und 698 und für 2D280 249 und 318. Die niedrigeren Werte für 2D280 können nur mit der niedrigeren Brightness erklärt werden, wobei eine verständlichere und systematische Erklärung bisher nicht möglich ist. Auch für das IFI sind die Single-Werte kleiner als die Double-Werte bzw. für die YAC-Klone größer gegenüber den Lambda-Klonen.

IV.4.7 Distanzen zwischen genetischen Markern

Der genomische Abstand für 2D279 und 2D280 betrug 2Mbp. Für 2D279 wurde eine totale mittlere Distanz von 694±33nm, eine Distanz 1 von 758±41 nm und eine Distanz 2 von 523±44 nm gefunden. Für 2D280 waren dies für die totale mittlere Distanz 848±31 nm, für Distanz 1 922±39 nm und für Distanz 2 673±34 nm. Der Unterschied in der totalen mittleren Distanz beträgt somit 110 nm, obwohl dieselben Klone verwendet wurden. Der Abstand von

der totalen Distanz zu Distanz1 und Distanz2 ist für beide Objekträger ungefähr gleich. Alle Werte sind signifikant unterschiedlich und wurden alle auf mindestens 4 Arten mit JMP getestet.
Eine Erklärung liegt in den unterschiedlichen Volumina der beiden Objekträger, die sich um 35% für die Single-Signale unterscheiden. Ein Signal wächst dadurch in seinem Durchmesser um ca. 18%. Durch die Volumenvergrößerung lassen sich die Signale jedoch auch weniger leicht trennen. Da man beim Auswählen der Kerne aber darauf bedacht ist, immer vier Signale zu trennen, wählt man bei 2d280 automatisch Signale mit größerem Abstand aus. Im CLSM konnte der Durchmesser eines Signals mit Hilfe der Funktion „Intensitäts-Profil" auf ca. 450 nm bestimmt werden.
Eine Vergrößerung entspricht also einem Anwachsen des Durchmessers auf ca. 530 nm. Für den Abstand zweier Signale bedeutet dies, daß er ca. 80 nm größer ist, was in der Größenordnung des beobachteten Effektes liegt. Eine genauere Analyse kann aufgrund der derzeitigen Datenlage leider noch nicht erfolgen.
Für 3D283 konnte eine totale mittlere Distanz von 358±34 nm, eine Distanz 1 von 410±42 nm und eine Distanz von 177±37 nm für einen genomischen Abstand von 194kbp bestimmt werden.
Für 3D285 und eine genomische Distanz von 69kbp betrug der Wert für die totale mittlere Distanz 561±41 nm, für Distanz 1 586±44 nm und für Distanz 2 461±90 nm.
Diese Werte müssen jedoch aus zwei Gründen mit Vorsicht behandelt werden: Erstens waren durch die überbelichteten Aufnahmen viele Kerne nach der Segmentierung fragmentiert, so daß Fehler bei der Distanzbestimmung gemacht werden konnten. In welcher Größenordnung dieser liegt, kann bisher allerdings nicht abgeschätzt werden. Zweitens waren vor allem bei der

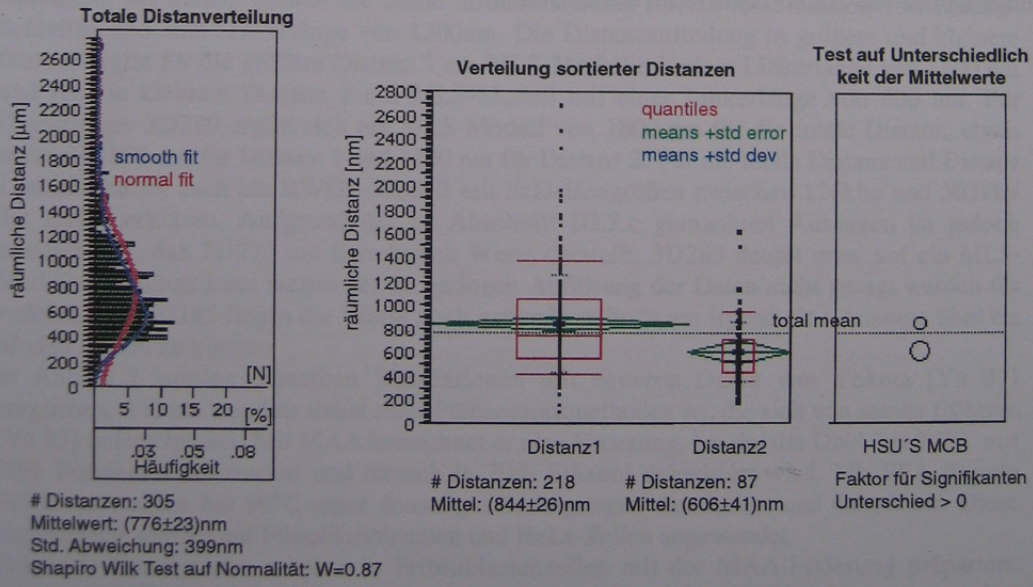


Abb.IV. 8:
Distanzverteilung und Signifikanztest:
Links: Häufigkeitsverteilung aller Distanzen von Objektträger 2D279 und 2D280
Rechts: Im linken Bild sind die Sortierergebnisse in Distanz 1 und 2 dargestellt. Im rechten Bild zeigen die beiden sich nicht berührenden Kreise, daß der Unterschied der Mittelwerte signifikant verschieden ist. Es wurde der HSU-MCB Test verwendet [SAS 96].

Distanz 2 nur noch wenige Distanzen auszuwerten bzw. generell viele Signale nicht mehr zu trennen. Dadurch dürfte die Statistik dieser Distanzen nur die größeren Distanzen erfaßt haben. Allerdings ist klar zu sehen, daß für eine größere genomische Distanz eine kleinere räumliche Abstandsverteilung resultiert.
Interessant ist weiterhin, daß die Standardabweichung für alle totalen Distanzen zwischen 350 und 400 nm liegt. Sollte es sich herausstellen, daß die Standardabweichung auch bei weiteren Messungen in diesem Bereich liegt, so könnte dies auf einen Einfluß der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung hindeuten, da eine solche Einförmigkeit nicht zu erwarten wäre. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Distanzen bei verschiedenen Experimentatoren konnte nicht festgestellt werden.
Eine Analyse ergab, daß die von Rauch aufgenommenen Zellkerne generell etwas kleinere Mittelwerte in den Distanzen zur Folge hatten. Dies ist darauf zurückzuführen, daß T. A. K. hauptsächlich als erster Aufnahmen auf einem Objekträger vornahm. Es ist deshalb wahrscheinlich, daß der Autor besonders augenfällige Kerne mit gut sichtbaren 4 Signalen aufnahm, die Rauch nicht mehr zur Verfügung standen.
Alle hier gezeigten Abstände sind signifikant verschieden, so daß damit gemachte Aussagen statistisch gesichert sind. Stellvertretend soll eine Distanzverteilung gezeigt werden, die durch Mittelung von Objektträger 2D279 und 2D280 erhalten wurde (Abb.IV.10).

IV.4.8 Distanzen zwischen homologen Chromosomen

Die Distanzen liegen zwischen 8,5 µm und 10,2±0,5 µm, was mit den Erwartungen und einer Zellkerngröße von 20µm*12µm*6µm übereinstimmt.

V Vergleich zwischen Simulation und Experiment

Die Simulationsdaten entsprechen Abb.III.24, d.h. alle Simulationskurven stammen von Simulationen mit niedriger Excluded-Volume-Wechselwirkung. In Abb.IV.1 wird zunächst ein Vergleich zwischen den Simulationen und den Daten von van den Engh [vdE92], Yokota [Yo 92], Monier [unpublished], und den im experimentellen Teil dieser Arbeit gewonnen Daten dargestellt.
Die Daten von van den Engh zeigen ein äußerst zwiespältiges Verhalten. Während sie unterhalb von 500kbp zu einem MLS-Modell passen könnten, sind sie oberhalb von 500kbp mit verschiedenen RWGL-Modellen vereinbar. Oberhalb von 1Mbp entsprechen die Daten nicht einmal einem RWGL-Modell mit 5Mbp großen Schleifen. Dies ist wahrscheinlich auf die von van den Engh benutzte und sehr strukturzerstörende Präparation zurückzuführen.
Die Daten von Yokota, die mit einer istotonischen Präparation gewonnen wurden, passen dagegen sehr gut zu einem MLS-Modell mit 126kbp großen Schleifen mit einem Linker von 1200nm. Hier ist zu berücksichtigen, das die Daten von Yokota 2D-Aufnahmen sind, also um ca. 2/3 zu klein sind und um diesen Faktor korrigiert werden müssen.
Die Daten von Monier passen sehr gut zu einem MLS-Modell. Aufgrund der noch zu geringen Auflösung läßt sich jedoch noch nicht sagen, welchen Parametern die Meßwerte genau entsprechen. Die Daten von Monier stellen bisher jedoch die besten und in ihrer Gesamtheit eindeutigsten Werte dar.
Die Werte des experimentellen Teils dieser Arbeit zeigen dagegen ein uneinheitliches Verhalten: bei 2D279 spricht die totale mittlere Distanz für ein MLS-Modell von 126kbp-Schleifen und eine Linkerlänge von 1200nm. Die Distanzaufteilung in größere und kleinere Distanz ergibt für die größere Distanz 1 ein MLS-Modell mit einer Linkerlänge von 1800 nm und für die kleinere Distanz 2 ein MLS-Modell mit einer Linkerlänge von 600 nm. Für Objektträger 2D280 ergibt sich ein MLS-Modell von 1800 nm für die totale Distanz, etwas mehr als 1800 nm für Distanz 1 und 1200 nm für Distanz 2. Für die totale Distanz und Distanz 1 würde jedoch auch ein RWGL-Modell mit Schleifengrößen zwischen 126kbp und 503kbp die Daten erklären. Aufgrund der in Abschnitt III.3.c gemachten Aussagen ist jedoch anzunehmen, daß 2D279 die korrekteren Werte darstellt. 3D283 deutet zwar auf ein MLS-Modell, allerdings kann wegen der zu geringen Auflösung der Daten nicht gesagt werden für welches. Für 3D285 liegen die Werte noch generell zu hoch um irgend eine Aussage über ein Modell treffen zu können.
In Abb.IV.2 werden dieselben Simulationen mit neueren Daten von Yokota [Yo 97] verglichen. Yokota wendete dabei zwei Präparationsmethoden an, die sich von seinen früheren [Yo 95] unterscheiden. Mit MAA bezeichnet er eine Fixierung, bei der die DNA bei 70°C mit 70% Formamid denaturiert und danach in 70% Ethanol dehydriert wird. Mit PFA fixierte Zellkerne werden bei 90°C unter denselben Bedingungen denaturiert und dehydriert. Diese Fixierungen wurden auf Fibroblastenzellen und HeLa-Zellen angewendet.
Folgende Genregionen wurden in Fribroblastenzellen mit der MAA-Fixierung präpariert: 4p16,3, 6p21,3, 21q22.2, Xq28, und Xp21.3. In Fibroblastenzellen mit PFA-Fixierung wurden Xq21.3 und Xq28, und in HeLa-Zellen mit MAA-Fixierung wurden Xq28 und Xp21.3 präpariert. Von der MAA-Fixierung in Fibroblastenzellen ergibt der Vergleich mit den Simulationen für 4p16.3 ein RWGL-Modell mit 5Mbp- oder 4Mbp-Schleifen. Für 6p21.3 ergibt sich ein RWGL-Modell mit 3Mbp- oder 2Mbp-Schleifen. Für 21q.2 und Xp21.3 ergibt

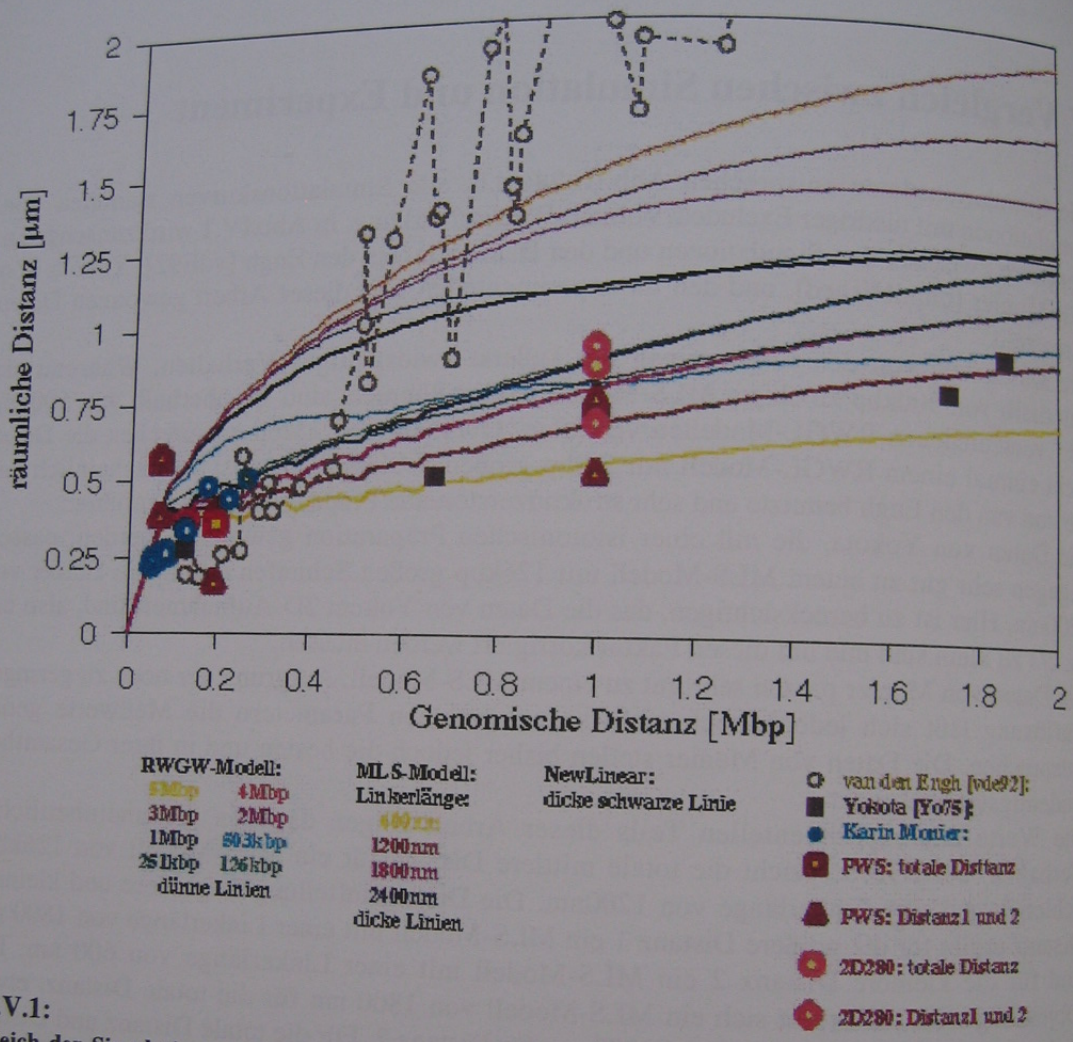


Abb.V.1:
Vergleich der Simulationen mit Daten von van den Engh [vdE 92], Yokota [Yo95], Monier und den in dieser Arbeit gemessenen Daten.

sich ein uneinheitliches Bild, das einem RWGL-Modell mit Schleifen von ungefähr 1Mbp entspricht. Für die PFA fixierten Fibroblastenzellkerne ergibt sich für Xp21.3 ein MLS-Modell mit 1800nm Linkerlänge und für Xq28 ein RWGL-Modell mit einer Schleifengröße von etwas unterhalb von 1Mbp. Für MAA-fixierter HaLa-Zellkerne ergeben sich für die Genloci jeweils dieselben Ergebnisse. Dies deutet auf eine Unabhängigkeit der Ergebnisse von der Fixierung und dem Zelltyp hin.
Vor allem bei kleineren genomischen Abständen ist jedoch die Auflösung der Simulationen noch zu gering, um Genaueres zu sagen.

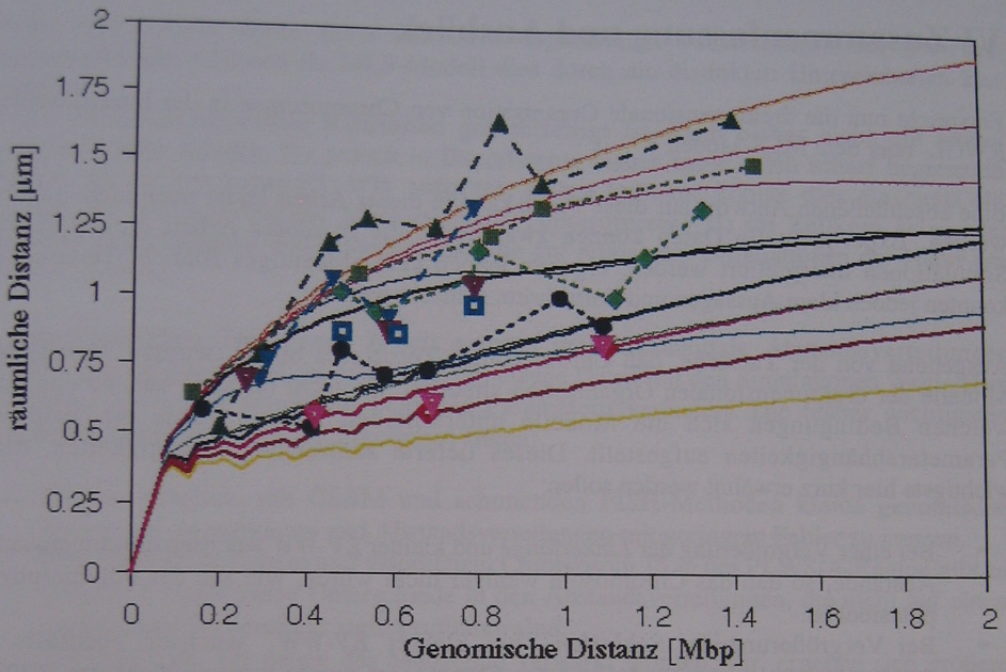


Abb.V.2:
Vergleich der Simulationen mit Daten von Yokota [Yo 95].

VI Zusammenfassung und Ausblick

Entspricht nun die dreidimensionale Organisation von Chromosomen in der Interphase dem RWGL- oder dem MLS-Modell ?

Eine abschließende Antwort auf diese Frage kann in dieser Arbeit leider noch nicht gegeben werden. Experimentelle Daten können zwar durch die in dieser Arbeit durchgeführten Simulationen interpretiert werden, ergeben jedoch kein eindeutiges Bild. In Teilaspekten konnten jedoch klare Aussagen und Fortschritte gemacht werden:

Ausgehend von der Tatsache, daß Chromosomen Territorien bilden, wurden verschiedene Modelle der dreidimensionalen Organisation simuliert. Da nicht bekannt war, ob und unter welchen Bedingungen sich die Modelle unterscheiden lassen, wurde ein Feld von Parameterabhängigkeiten aufgestellt. Dieses lieferte zahlreiche Abhängigkeiten, deren wichtigste hier kurz erwähnt werden sollen:

- Bei einer Vergrößerung der *Linkerlänge* und kleiner *EV-WW* wuchsen dreidimensionale Abstände, so daß das Chromosom weniger dicht wurde, wie aus der Polymerphysik plausibel ist.
- Bei Vergrößerung der *Schleifen* bei kleiner *EV-WW* wuchsen ebenfalls die dreidimensionalen Abstände, und das Chromosom wurde weniger dicht. Im RWGL-Modell ist dies durch die großen Schleifen bedingt. Im MLS-Modell kann dies nur durch eine Wechselwirkung der Rosetten erklärt werden.
- Bei hoher *EV-WW* waren die Chromosomen durchweg schlecht relaxiert und die Abstände niedriger als bei geringer EV-WW, da Umlagerungen von Teilen des Moleküls in einem hohen Potentialtopf sehr langsam ablaufen.
- Bei hoher *EV-WW* bildeten sich durch den hohen Potentialtopf kompakte Gebilde mit definierter Oberfläche. Bei niedriger *EV-WW* kann man jedoch nicht von einer Oberfläche des Chromosoms, aufgrund der hohen Dynamik und Zugänglichkeit zum Innern, sprechen.
- Der größte Teil des Chromosoms hält sich, wie die Aufenthaltswahrscheinlichkeit zeigte, in einem Randbereich von ca. 1 µm auf und zeigt starke Dynamik.

- Darüberhinaus bilden die Rosetten im MLS-Modell distinkte Einheiten, während die großen Schleifen im RWGL-Modell sich durchdringen können.

Außerdem konnte gezeigt werden, daß die Simulation eines RWGL-Modells mit den theoretischen Vorhersagen von Sachs übereinstimmt.
RWGL- und MLS-Modell zeigen klare Unterschiede, die jedoch stark von der Parameterwahl abhängen. Dies bezieht sich vor allem auf die Bestimmung räumlicher Abstandsverteilungen.

Faßt man dies zusammen, so gelangt man zu folgenden Einschätzungen der Modelle:
Unter der Annahme, daß die Ergebnisse der Simulationen bei hoher EV-WW schlecht relaxiert sind und damit Aussagen nur von Simulationen mit niedriger EV-WW gewonnen werden können, besitzen Chromosomen keine definierten Oberflächen und zeigen darüberhinaus im Außenbereich starke Dynamik und Zugänglichkeit. Dies widerspricht dem ICD-Modell und Experimenten, die Gene relativ zur Chromosomenoberfläche genau lokalisieren. Das RWGL-

Modell widerspricht durch seine unscharfe Organisation Vorstellungen der gezielten Genomregulation, während im MLS-Modell dies durch die distinkten Untereinheiten klar gegeben ist.
Ob die Annahme schlechter Relaxation gerechtfertigt ist, kann bisher nicht mit letzter Sicherheit gesagt werden. Da jedoch in Experimente bisher keine solch scharf begrenzten Gebilde, wie sie bei hoher EV-WW auftreten, zeigen konnten, könnte dies einerseits ein Hinweis auf streßrelaxierende Mechanismen (Topoisomerase II) im Zellkern sein, oder schlichtweg die Tatsache widerspiegeln, daß die gut relaxierten Simulationen der Natur am nächsten kommen.

Im experimentellen Teil dieser Arbeit wurden dreidimensionale Abstandsverteilungen zwischen genomischen Markern gemessen, um eigene Daten mit den Simulationen vergleichen zu können. Auch hier wurde ein Feld von Parametern verändert. Die bisher wichtigsten gefundenen Abhängigkeiten und Ergebnisse lauten:

- Es war möglich, mit CLSM und schonenden FISH-Methoden kleine genomische Sequenzen zu markieren und Abstandsverteilungen mit geringem Fehler zu messen.
- Zwischen mütterlichem und väterlichem Chromosom 15 in der PLWS/A-Region gibt es statistisch signifikante Unterschiede in den Abstandsverteilungen, die nicht auf einen statistischen Sortiereffekt zurückzuführen sind.
- Für Präparate, bei denen das Meßsignal verstärkt worden war, ergeben sich größere Abstandsverteilungen, aufgrund einer Auswahl beim Aufnehmen der Zellkerne.
- Für kleine genomische Abstände unterhalb von 200kbp kann keine exakte Abstandsverteilung bei einfarbiger Markierung der Markerpaare mehr bestimmt werden, da die Signale oft nicht trennbar sind. Dies führte zu zu großen Mittelwerten in der Abstandsverteilung. Allerdings ist auch hier noch ein Unterschied zwischen mütterlichem und väterlichem Chromosom erkennbar.

Ein Vergleich zwischen Experimente und Simulationen ergibt folgendes Bild:
Die bisher durchgeführten Experimente verschiedener Arbeitsgruppen lassen sich durch verschiedene Modelle interpretieren. Eine Systematik ist hierbei nicht erkennbar. Die Daten von Yokota lassen sich jedoch häufig durch ein RWGL-Modell mit sehr großen Schleifen beschreiben. Hier besteht die Vermutung, daß dies auf Präparationsartefakte zurückzuführen ist. Die in dieser Arbeit gemachten Experimente favorisieren eher das MLS-Modell. Für kleine genomische Abstände zeigen diese Daten jedoch kein klares Bild, da sie nur einfarbig markiert waren. Die Abstände liegen dabei zu hoch, da die Verteilungen zu großen Abständen verschoben sind.
Mit einer schonenden Präparation maß Yokota jedoch auch Daten, die einem MLS-Model entsprechen. Die entscheidenden Faktoren sind unbekant.

Diese Interpretation ging davon aus, daß die Simulationen korrekt sind. Umgekehrt könnte es jedoch sein, daß die Experimente klares Verhalten zeigen, die Simulationen dagegen verbesserungswürdig sind. Da aber das RWGL-Modell durch die Simulationen korrekt beschrieben wurde, ist dies eher unwahrscheinlich.

Um zukünftige Fragestellungen der Zellkernorganisation zu untersuchen, wurden fraktale Analyseverfahren in den Simulationen eingesetzt. Hierbei konnte erstmals für eine zelluläre Organisationsstruktur ihr multifraktaler Aufbau in den Simulationen gezeigt werden.
Im RWGL- und MLS-Modell konnte gezeigt werden, daß die Bereiche, in der eine bestimmte fraktale Dimension gültig ist, den Organisationsniveaus der entsprechenden Modelle entspricht. Bisher resultierten alle Parameteränderungen in den Modellen in einer spezifischen Änderung der fraktalen Dimension. Jede Simulation konnte damit gegen andere Simulationen abgegrenzt werden. Abhängigkeiten, die sich nicht in der fraktalen Dimension niederschlugen, müssen mittlerweile mit Vorsicht betrachtet werden.
Da es für viele komplexe Systeme - wie zum Beispiel Polymere, Gele oder Mineralien - gut dokumentierte fraktale Analysen gibt, könnten somit zur Interpretation herangezogen werden. Zugrundeliegende Prinzipien der Organisation des Zellkerns könnten, dabei mit in Gesetzmäßigkeiten aus anderen naturwissenschaftlichen Bereichen in Zusammenhang gebracht werden.

Ausblick:
Ausgehend von den Monte-Carlo-Simulationen können die Brownschen-Dynamik-Simulationen ausgewertet werden. Die Ergebnisse werden wegen der kürzeren Segmentlänge nicht nur eine bessere Unterscheidung zwischen den Modellen aufgrund höherer Auflösung zulassen, sondern auch lokale Abstände zugänglich machen. Damit wird theoretisch eine Entscheidung über die Position von Schleifenbasispunkten aufgrund der Form der Abstandsverteilung und deren Mittelwert möglich. Sollten sich die Schleifenbasispunkte als fest herausstellen, so müßte hierfür eine spezifische Sequenz vorhanden sein. Eine solche Sequenz konnte bisher allerdngs nicht gefunden werden. Es ist anzunehmen, daß eine solche Sequenz in den 97% nicht kodierenden Regionen liegt. Weitere Simulationen müssen durchgeführt werden, um einige der bisher unentschiedenen Effekte genauer zu klären.

Auf der experimentellen Seite müssen mehr Distanzverteilungen gemessen werden, um zwischen den Modellen zu unterscheiden. Hierbei muß vor allem der Untschied zwischen mütterlichem und väterlichem Chromosom 15 direkt nachgewiesen werden. Hierzu kann eine Zellinie benutzt werden, bei der eine Translokation auf Chromosom 15 die Herkunft des mütterlichen Chromosoms anzeigt. Auch die Aufnahmetechnik kann noch verbessert werden, um schnellere Kontrolle über die Aufnahmen zu erhalten.

Im Vergleich zwischen experimentellen und simulierten Daten kann dann vielleicht auch eine Entscheidung über die dreidimensionale Organisation von Chromosom 15 erfolgen.

Für eine Fortführung der fraktalen Analyse wird die fraktale Dimension des Volumens bestimmt werden, welches sich zwischen den Chromatinfasern befindet. Hierzu wird das aufwendige Box-Verfahren verwendet werden. Da aus der Multifraktalität der Chromosomen in den Simulationen auch eine Multifraktalität des Zwischenraumes folgt, können damit Vorhersagen über das Diffusionsverhalten im Zellkern gemacht werden.

Anhang

Konfi-gurations-name	Schleifen Größe [kbp]	Schleifen Position	Schleifen Form	Linker Länge [nm]	Linker Form	Excluded Volume [kT]	MC Schritte [*1000]
ac15MLS96	126	trans	loop	600	loop	1.0	395
a1c15MLS96	126	trans	loop	600	loop	0.1	756
bc15MLS96	126	cis	loop	600	loop	1.0	395
b1c15MLS96	126	cis	loop	600	loop	0.1	561
cc15MLS96	126	trans	loop	1200	loop	1.0	411
c1c15MLS96	126	trans	loop	1200	loop	0.1	530
dc15MLS96	126	cis	loop	1200	loop	1.0	411
d1c15MLS96	126	cis	loop	1200	loop	0.1	426
ec15MLS96	126	trans	loop	1800	loop	1.0	408
e1c15MLS96	126	trans	loop	1800	loop	0.1	348
fc15MLS96	126	cis	loop	1800	loop	1.0	408
f1c15MLS96	126	cis	loop	1800	loop	0.1	331
gc15MLS96	126	trans	loop	2400	loop	1.0	750
g1c15MLS96	126	trans	loop	2400	loop	0.1	335
hc15MLS96	126	cis	loop	2400	loop	1.0	695
h1c15MLS96	126	cis	loop	2400	loop	0.1	270

Tab.A.1:
Simulationsansätze des MLS-Modells, Feld 1

Konfig uration Name	**Schlei fen Göße [kbp]**	**Schleif en Posi tion**	**Schlei fen Form**	**Linker Länge [nm]**	**Linker Form**	**Seg ment Länge [nm]**	**Excluded Volume [kT]**	**MC Schritte [*1000]**
c1c15SmallMLS96	80	trans	loop	1200	loop	200	0.1	321
d1c15SmallMLS96	100	trans	loop	1200	loop	200	0.1	443
e1c15SmallMLS96	158	trans	loop	1200	loop	300	0.1	326
f1c15SmallMLS96	251	trans	loop	1200	loop	300	0.1	420

Tab.A.2:
Simulationsansätze von Simulationszyklus III.

Konfiguration Name	Schleifen Göße [Mbp]	Schleifen Form	Linker Länge [nm]	Linker Form	Excluded Volume [kT]	MC Schritte [*1000]
ac15GIANT2D20	5.0	2D-random	3600	loop	1.0	312
a1c15GIANT2D20	5.0	2D-random	3600	loop	0.1	574
bc15GIANT2D20	5.0	2D-random	3600	random	1.0	291
b1c15GIANT2D20	5.0	2D-random	3600	loop	0.1	381
c1c15GIANT3D20	5.0	3D-random	3600	loop	0.1	328
d1c15GIANT3D20	5.0	3D-random	3600	random	0.1	285
ec15GIANT2D25	4.0	2D-random	3000	random	1.0	374
e1c15GIANT3D25	4.0	3D-random	3000	random	0.1	466
fc15GIANT2D33	3.0	2D-random	2400	random	1.0	800
f1c15GIANT3D33	3.0	3D-random	2400	random	0.1	347
gc15GIANT2D48	2.0	2D-random	1800	random	1.0	543
g1c15GIANT3D48	2.0	3D-random	1800	random	0.1	214
hc15GIANT1D94	1.0	loop	1200	loop	1.0	544
h1c15GIANT1D94	1.0	loop	1200	loop	0.1	420
h2c15GIANT3D94	1.0	3D-random	1200	loop	0.1	495
ic15GIANT1D187	0.503	loop	600	loop	1.0	323
i1c15GIANT1D187	0.503	loop	600	loop	0.1	281
kc15GIANT1D338	0.251	loop	600	loop	1.0	730
k1c15GIANT1D338	0.251	loop	600	loop	0.1	449
lc15GIANT1D561	0.126	loop	600	loop	1.0	175
l1c15GIANT1D561	0.126	loop	600	loop	0.1	414

Tab.A.3:
Simulationsansätze für das RWGL-Modell.

Konfiguration Name	Schleifen Größe [kbp]	Schleifen Form	Linker Länge [nm]	Linker Form	Excluded Volume [kT]	MC Schritte [*1000]
a1c15GI850TAK3D32	126	3D-random	3600	random	0.1	213
a1c15GI2550TAK3D96	126	3D-random	3600	random	0.1	218
b1c15GI2550TAK2D96	126	2D-random	3600	loop	0.1	329
Linear15MLS96	126	loop	1200	loop	1.0	2675
1Linear15MLS96	126	loop	1200	loop	0.1	2080
1NewLinear15MLS96	126	loop	1200	loop	0.1	486

Tab.A.4:
Simulationsansätze anderer Modelle.

Konfiguration	Euklid Cut-Off D	R	Fraktal Zone I D	R	Fraktal ZoneII D	R	Fraktal ZoneIII D	R	Fraktal ZoneIV D	R	Max Cut-Off D	R
ac15MLS96	1,07	0,999	2,84	0,998	3,68	0,999	1.70	0,997			4,32	0,989
a1c15MLS96	1,08	0,999	2,67	0,999	3,13	0,999	2,07	0,999	2,43	0,995		
bc15MLS96	1,07	0,999	2,71	0.999	3.64	0.999	1,601	0.998			6,33	0,995
b1c15MLS96	1,08	0,999	2.63	0.999	3.07	0.999	2,07	0.999	2.39	0,999		
cc15MLS96	1,07	0,999	2,85	0.999	3,56	0.999	1.60	0,998			4,95	0.980
c1c15MLS96	1,08	0.999	2,50	0.999	2,89	0,998	2,06	0.999	2,25	0.999		
dc15MLS96	1,07	0.999	2,98	0.998	3,66	0,999	1,86	0,997			5,34	0,992
d1c15MLS96	1,08	0,999	2,50	0,999	2,96	0,999	2,03	0,999	2,15	0,999		
ec15MLS96	1,07	0,999	2,7	0.998	3,40	0,999	1,97	0,997			5,37	0,997
e1c15MLS96	1,07	0.999	2,38	0.998	3,11	0.999	2,083	0,999				
fc15MLS96	1,07	0,999	2,77	0,998	3,19	0,999	1,86	0,998			4,72	0,997
f1c15MLS96	1,07	0,999	2,15	0.999	2,95	0,999	2,11	0,999				
gc15MLS96	1,07	0,999	2,51	0,999	2,70	0,998	2,17	0,999				
g1c15MLS96	1,07	0,999	2,23	0,999	2,49	0,998	1,98	1,0				
hc15MLS96	1,07	0,999	2,62	0,999	2,83	0,998	2,12	0,998				
h1c15MLS96	1,07	0.999	2,20	0,999	2,42	0,999	1,98	0.999	2,28	0.986		

Tab.A.5:

Fraktale Dimensionen mit in ihren Zonen mit Korrelationskoeffizient des Fits für MLS-Feld I.

Konfiguration	Euklid Cut-Off D	R	Fraktal Zone I D	R	Fraktal ZoneII D	R	Fraktal ZoneIII D	R
c1c15SmallMLS96	1,05	0,999	2,31	0,999	2,96	0,998	2,01	0,999
d1c15SmallMLS96	1,07	0,999	2,26	0,998	2,92	0,997	1,94	0,999
e1c15SmallMLS96	1,07	0,999	2,47	0,998	3,035	0,998	2,08	1,0
f1c15SmallMLS96	1,07	0,999	2,20	0,999	2,95	0,999	2,09	1,0

Tab.A.6:

Fraktale Dimensionen mit in ihren Zonen mit Korrelationskoeffizient des Fitts für MLS-Feld 2.

Konfiguration	Euklid Cut-Off D	R	Fraktal Zone I D	R	Fraktal ZoneII D	R	Fraktal ZoneIII D	R
ac15GIANT2D20	1,05	0,999	1,81	0,999	2,60	0,998		
a1c15GIANT2D20	1,06	0,999	1,82	0,999	2,67	0,999		
bc15GIANT2D20	1,05	0,999	1,81	0,999	2,32	0,999		
b1c15GIANT2D20	1,06	0,999	1,76	0,999	2,45	0,998		
c1c15GIANT3D20	1,06	0,999	1,83	0,999	2,70	0,999		
d1c15GIANT3D20	1,06	0,999	1,83	0,999	2,78	0,999		
ec15GIANT2D25	1,05	0,999	1,76	0,999	2,40	1,0		
e1c15GIANT3D25	1,05	0,999	1,82	0,999	2,81	0,998		
fc15GIANT2D33	1,06	0,999	1,83	0,999	3,05	0,999		
f1c15GIANT3D33	1,06	0,999	1,89	0,999	3,04	0,999		
gc15GIANT2D48	1,05	0,999	1,79	0,999	2,50	0,999		
g1c15GIANT3D48	1,06	0,999	1,86	0,999	2,99	0,999		
hc15GIANT1D94	1,05	0,999	1,78	0,999	2,77	0,999		
h1c15GIANT1D94	1,06	0,999	1,92	0,999	2,63	0,999		
h2c15GIANT3D94	1,06	0,999	1,84	0,999	2,74	0,999		
ic15GIANT1D187	1,06	0,999	1,91	0,998	2,69	0,999	2,36	0,999
i1c15GIANT1D187	1,07	0,999	1,87	0,998	2,75	0,999	2,47	0,999
kc15GIANT1D338	1,07	0,999	2,19	0,998	2,54	0,999	1,71	0,999
k1c15GIANT1D338	1,06	0,999	2,16	0,999	2,43	0,999	2,04	1,0
lc15GIANT1D561	1,07	0,999	2,76	0,999	1,26	0,999	1,46	0,999
l1c15GIANT1D561	1,07	0,999	2,23	0,999	1,93	1,0		

Tab.II.7:

Fraktale Dimensionen mit in ihren Zonen mit Korrelationskoeffizient des Fitts für das RWGL-Model.

Konfiguration	Euklid Cut-Off D	R	Fraktal Zone I D	R	Fraktal ZoneII D	R
a1c15GI850TAK3D32	1,06	0,999	1,80	0,999	2,73	0,998
a1c15GI2550TAK3D96	1,06	0,999	2,04	0,998	2,86	0,999
b1c15GI2550TAK2D96	1,05	0,999	1,96	0,998	2,75	0,999
1NewLinear15MLS96	1,06	0,999	1,99	0,998	2,69	0,999

Tab.II.8:

Fraktale Dimensionen mit in ihren Zonen mit Korrelationskoeffizient des Fits für andere Modelle.

Literaturverzeichnis

[AdKr 83] K. W. Adolph and L. R. Kreisman, "Surface structure and isolated metaphase chromosomes", Experimental Cell Research 147:155-166, 1983.

[Al 94] Alberts et. al. "Molecular Biology of the Cell", Garland Publications, New York, 1994.

[AlTi 87] M. P. Allen and D. J. Tildesley, "Computer Simulation of Liquids", Clarendon Press, Oxford, UK, 1987.

[Av 89] David Avnir, editor, "The Fractal Approach to Heterogeneous chemistry", John Wiley & Sons, 1989.

[Av 98] David Avnir, Ofer Biham, Daniel Lidar, Ofer Malcai, "Is the Geometry of Nature Fractal", Science 279:39-40,1998.

[BeWo 76] C. Benyati and A. Worcel, "Isolation, characterization and strucutre of the folded interphase genome of Drosophilia melangoster", Cell 8:393-407, 1976.

[BlFa] Bloom and Fawcett, "A Textbook of Histology", Chapman and Hall, 12th edition.

[Bo 09] T. Boveri, "Die Blastomerenkerne von Ascaris meglocephala und die Theorie der Chromosomenindiviualität", Archiv für Zellforschung 3, 181-268, 1909.

[Bor 98] H. Bornfleth, K. Sätzler, R. Eils, C. Cremer, "High-precision distance measurements and volume-conserving segmentation of objects near and below the resolution limit in three-dimensional confocal fluorescence microscopy", accepted Journal of Microscopy 189, 1989.

[Br 91] "Brockhaus Enzyklopädie in 24 Bänden", 19. völlig neu bearbeitete Ausgabe, 1991.

[Bra 79] G. J. Brakenhoff, P. Blom, P. Barends, "Confocal scanning light microscopy with high aperture immersion lenses", Journal of Microscopy 117:219-232, 1979.

[BrBä 86] Jürgen Brickmann und Hans-Jürgen Bär, "Chaos und fraktale Dimension", Nachrichten für das Chemisch, Technische Labor 34, Nr. 6:566-572, 1986.

[ChLa 94] Giuseppe Chirico and Jörg Langowski, " Kinetics of DNA super coiling studied by Brownian dynamics simulation", Biopolymers 34:415-433, 1994.

[Co 68] D. E. Comings, "The rationale for an ordered arrangement of chromatin in the interphase nucleus", American Jum. of Genetics 20, 440, 1968.

[Co 78] David E. Comings, "Mechanisms of Chromosomal Banding and Implications for Chromosome Structure", Annual Revue of Genetics 12:25-46, 1978.

[Coen 90] E. S. Coen, J. M. Romero, S. Doyle, R. Elliot, G. Murphy, R. Carpenter, "Floricaula: a homeotic gene required for flower development in Anti-rrhinum majus", Cell 63:1311-1322, 1990.

[Cook 76] P. R. Cook, I. A. Brazell and E. Jost, "Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA", Journal of Cell Science 22:303-324, 1976.

[Cr 74] C. Cremer, C.Zorn, T. Cremer, "An ultraviolet microbeam for 257nm" Microscopica Acta 75:331-337, 1974.

[Cr 82a] T. Cremer, C. Cremer, H. Baumann, E.K. Luedtke, K. Sperling, V. Teubner and C. Zorn, "Rabl-s model of the interphase chromosome arrangement, tested in chinese hamster cells by premature chromosome condensation and Laser-UV-Microbeam experiments", Human Genetics 60:46-46, 1982.

[Cr 82b] T. Cremer, C. Cremer, T. Schneider, H. Baumann, L. Hens and M. Kirsch-Volders, "Analysis of chromosome positions in the interphase nucleus of Chinese hamster cells by laser-UV-microirradiation experiments" ,Human Genetics 62: 201, 1982.

[Cr 84] T. Cremer, H. Baumann, K. Nakaniski, C. Cremer, "Correlation between interphase and metaphase chromosome arrangements as studied by laser-uv-microbeam experiments", in M. D. Bennnet, A. Cropp, U. Wolf (eds.) Chromosomes today, 8. Allan and Unwin London, 203-212, 1984.

[Cr 88] T. Cremer, P. Lichter, J. Borden, D. C. Ward and L. Manuelidis, "Detection of chromosome aberations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome specific library probes", Human Genetics 80:235, 1988.

[Cr 93] T. Cremer, A. Kurz, R. Zirbel, S. Dietzel, B. Rinke, E. SchrYck, M. R. Speicher, U. Mathie, A. Jauch, P. Emmerich, H. Scherhan, T. Ried, C. Cremer and P. Lichter, "Role of Chromosome Territories in the Functional Compartmentalization of the Cell Nucleus", Cold Spring Harbor Sump. Quant. Biol. 58:777-792, 1993.

[Darw 59] Charles Darwin, "On the origin of species by means of natural selection or ...", 1959.

[Dik 84] R. E. Dickerson, "Base sequence and helix structure variation in B and A DNA", Journal of Molecular Biology 166:419-441, 1984.

[Doi 88] M. Doi and S. F. Edwards, "The theory of polymer dynamics", Oxford University Press, 1988.

[Du 70] E. J. Dupraw, "DNA and Chromosomes", New York: Holt, Rinehart, Winston. 1970.

[Eb 93] G. Ebert, "Biopolymere: Struktur und Eigenschaften", Teubner StudienbŸcher Chemie, B. G. Teubner Verlag Stuttgart, 1993.

[Ei95] R. Eils, E. Bertin, K. Saracoglu, B. Rinke, E. SchrYck, F. Parazza, Y. Usson, M. Robert-Nicoud, E. H. K. Stelzer, J.-M. Chassery, T. Cremer and C. Cremer, "Application of laser confocal microscopy and 3D-Voronoi diagrams for volume and surface estimates of interphase chromosomes", Journal of Microscopy 177:150-161, 1995.

[Ei 96] R. Eils, "Three-dimensional Reconstruction of Painted Human Interphase Chromosomes: Active and and Inactive X Chromosome Territories have similar volumes but Differ in Shape and Surface Structure", Journal of Cell Biology 135(6):1427-1440, 1996.

[ErMc 78] Donald L. Ermak and J. A. McCammon, "Brownian dynamics with hydrodynamic interactions", Journal of Chem. Phys. 69(4):1352-1360, 1978.

[Fr 94] Uta Francke, "Digitized and differentially shaded human chromosome ideograms for genomic applications", Cytogenetic Cell Genetics 65:206-219, 1994.

[GaPa 69] J. G. Gall and M. L. Pardue, "Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations", Genetics 63:378-383, 1969.

[GrKh 94] A. Y. Grosberg and A. R. Khokhlov, "Statistical Physics of Macromolecules", AIP Series in Polymers and Complex Systems, AIP Press, 1994.

[Ha 93] P. Hahnfeldt, J. E. Hearst, D. E. Brenner, R. K. Sachs and L. H. Hlatky, "Polymer models for interphase chromosomes", Proceedings of the National Academy of Sciences USA 90:7854-7858, 1993.

[HaPa 81] M. E. Harper and G. F. Saunders, "Localization of single copy DNA sequences on G-banded human chromosomes by in situ hybridzation", Chromosoma 83:431-439, 1981.

[HaSu 93] H. M. Hatings and G. Sugihara, "Fractals", Oxford University Press, 1993.

[HH 89] J. S. Heslop-Harrison, "The volumes and morphology of human chromosomes in mitotic reconstruction", Humane Genetics 84:27-34, 1989.

[HsHs 90] Kenneth J. Hsü and Andreas J. Hsü, "Fractal geometry of music", Proceedings of the National Academy of Sciences 87:938-941, 1990.

[HsHs 91] Kenneth J. Hsü and Andreas J. Hsü, "Self-similarity of the "1/f noise" called music", Proceedings of the National Academie of Science 88:3507-3509, 1991.

[In 90] P. W. Ingham, A. Hidalgo, A. M. Taylor, "Advantages and limitations of in situ hybridization as exemplified by the molecular genetic analysis of Drosophila development", Soc. Exp. Biol. Semin. Ser. 40:97114, 1990.

[ISCN 85] D. G. Harnden, H. P. Klinger (eds.), "An International System for Human Cytogenetic Nomenclature: Report of the Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature", S. Karger, Basel/NewYork, 1985. Published in collaboration with the March of Dimes Birth Defects Foundation and Cytogenet Cell Genet: Appendix 2, 1985.

[Jo 69] H. a. John, M. L. Birnstiel, K. W. Jones, "RNA-DNA hybrids at the cytological level", Nature 223:582-587, 1969.

[Ka 89] Brian H. Kaye, "A Random Walk Through Fractal Dimensions", VCH, Weinheim, FRG, 1989.

[Ko 83] M. L. Kopka, A. V. Fratini, H. R. Drew, R. E. Dickerson, "Ordered water structure around a B-DNA dodecamer", Journal of Molecular Biology, 163:129-146, 1983.

[KoCo 88] A. Kobori and D. R. Cox, "Molecular Biology of the Cell", edited by B. Albers, D. Bray, J. Lewis, M. Roff, K. Roberts and J. D. Watson, Garland Publishing Inc. , New York and London, p. 545, 1989.

[KoKu 81] R.D. Kornberg und A. Klug, "Das Nucleosom", Spektrum der Wissenschaft, 2:28-44, 1981.

[Ku 96] A. Kurz, S. Lampel, J. Nickolencko, J. Bradl, A. Benner, R. M. Zirbel, T. Cremer and P. Lichter, "Active and inactive genes localized in the periphery of chromosome territories", submitted.

[La 76] U. K. Laemmli, "Levels of organization of the DNA eukaryotic chromosomes", Pharmac. Review 30:469-476, 1976.

[Li 88] P. Lichter, T. Cremer, J. Borden, L. Manuelidis and D. C. Ward, "Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ hybridization and threedimensional reconstruction", Chromosoma 96:397-410, 1988.

[LiSa 97] Bing Liu and Rainer K. Sachs, "A two-backbone model for interphase chromosome geometry", Bulletin of Mathematical Biology 59.2:325-337, 1997.

[LiSe 74] C. C. Lin and L. A. Segel, "Mathematics Applied to Deterministic Problems in the Natural Sciences", Macmillan, New York, 1974.

[Lug 97] Karolin Luger et. al., "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution", Nature 389, 251 - 260, 1997.

[Ma 97] Andrew J. Maniotis, Christopher S. Chen and Donald E. Ingber, " Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure", Proceedings of the National Academy of Science 94:849-854, 1997.

[MaBa 97] Michael T. Madigan und Barry L. Mars, "Extremisten des Lebens", Spektrum der Wissenschaft, 86 - 94, Juni 1997.

[MaLa 79] M. P. F. Marsden and U. K. Laemmli, "Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model", Cell 17:849-858, 1979.

[Man 83] Benoit B. Mandelbrot, "The Fractal Geometry of Nature", W. H. Freeman and Company, New York, 1983.

[Mat 97] Karin A. Mattern, Raymond E. M. van Goethem, Luitzen de Jong and Roel van Driel, "Major Internal Nuclear Matrix Proteins Are Common to Different Human Cell Types", Journal of Cellular Biochemistry 65:42-52, 1997.

[Mi 57] Marvin Minsky, "Microscopy Apparatus", US-Patent #3013467.

[MoAr 93] E. Moudrianakis and G. Arents, "Structure of the histone octamer core of the nucleosome and its potential interactions with DNA.", DNA and Chromosomes, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 58:273-279, 1993.

[MR^2T^2 53] N. Metropolis, A. W. Rosenbluth, M. N. Rosenbluth, A. H. Teller, and E. Teller, "Equation of state calculations by fast computing machines", J. chem. Phys. 21:1087-92, 1953.

[Mü 98] Christian Münkel und Jörg Langowski, "Chromosme structure predicted by a polymer model", Phys. Rev. E, in press, 1998.

[Pa 80] D. M. Pardoll, B. Vogelstein and D. S. Coffey, "Localization of SV40 genes within supercoiled loop domains", Cell 19:527-536, 1980.

[PaLa 77] J. R. Paulson and U. K. Laemmli, " The structure of histone-depleted metaphase chromosomes", Cell 12:817-828, 1980.

[Ph 97] Private communication with Ronald L. Phair, Geophysicist, Director Offshore Division, Texaco Exploration and Production Inc..

[Pi 84[D. Pinkel, J. Landegent, C. Collins, J. Fuscoe, R. Segarves, J. Lucas and J. W. Gray, "Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocations of chromosome", 4. Proceedings of the National Academy of Science 85:9138, 1988.

[PiCo 84] Kenneth J. Pienta and Donald S. Coffey "A structural analysis of the role of the nuclear matrix and DNA loops in the organization of the nucleus and chromosome" in Higher Order Structure in the Nucleus, edited by P. R. Cook and R. A. Laskey, Journal of Cell Science, Supplement I:123-135, 1984

[Ra 85] C. Rabl "Über Zellteilung" Morphologisches Jahrbuch 10,214-330, 1885

[ReRu 77] A. E. Retief and R. Ruchel, "Histones removed by fixation. Their role in the mechanism of chromosomal banding.", Experimental Cell Research 106:233-237, 1977.

[RoPr 69] J. Rotne and S. Prager, "Variational treatment of hydrodynamic interactions on polymers", Journal Chem. Phys. 50:4831-4837, 1969.

[OlOl 74] Ada L. Olins and Donald E. Olins, "Spheroid Chromatin Units (v Bodies)", Science 183:330-332, 1974.

[Os 94] J. Y. Ostashevsky and C. S. Lange, "The 30nm chromatin fiber as a flexible polymer", Journal for Biomolecular Structure and Dynamics 11:813-820, 1994.

[Pau 86] Linus C. Pauling, "How to live longer and feel better", Freeman, 1986.

[Sa 95] R. K. Sachs, G. van den Engh, B. Trask, H. Yokota and J. E. Hearst, "A random-walk / giant-loop model for interphase chromosomes", Proceedings of the National Academy of Sciences 92:2710-2714, 1995.

[SAS 96] John Sall and Ann Lehman, "JMP - Start Statistics. A Guide to Statistics and Data Analysis Using JMP and JMP-IN Software", SAS Institute Inc., Duxbury, 1996.

[Schw 35] T. Schwann, "Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Pflanzen.", Verlag der Sanderschen Buchhandlung (G. E. Reiner), Berlin, 1835.

[St 77] S. M. Stack, D. B. Brown and W. C Dewey, " Visualization of interphase chromosomes", Journal of Cell Science 26:281, 1977.

[Ste 86] E. H. K. Stelzer, H. J. B. Marsmann and R. W. Wijnaendts van Resandt, "A Setup for a Confocal Scanning Laser Interference Microscope", Optik 73:30-33, 1986.

[Stry 95] Lubert Stryer, "Biochemistry", fourth edition, W. H. Freeman and Company, New York, 1995.

[Tr 91] B. J. Trask, H. Massa, S. Kenwrick and J. Gitscher, American Journal of Human Genetics 48:1, 1991.

[ZeFr 84] H. Zentgraf and W. Franke, "Differences of supranucleosomal organization in different kinds of chromatin: Cell typ-specific globular subunits containing different numbers of nucleosomes.", The Journal of Cell Biology 99:272-286, 1984.

[Ut 81] K. R. Utsumi, "Studies on the structure of chromosomes. II. Chromosome fibers as revealed by scanning electron microscopy", Cell Struct. Funct. 6:395-401, 1981.

[vdE 92] G. van den Engh, R. Sachs and B. J. Trask, "Estimating Genomic Distance form DNA Sequence Location in Cell Nuclei by a Random Walk Model", Science 257:1410-1412, 1992.

[vHZ 95] K. van Holde and J. Zlatanova "Chromatin higher order structure: Chasing a mirage ?" The Journal of Biological Chemistry, 270(15):8373-8376, April 1995.

[Vo 80] B. Vogelstein, D. M. Pardoll and D. S. Coffey, "Supercoiled loops and eucaryotic DNA replication", Cell 22:79-85, 1980.

[VoSc74] F. Vogel and T. M. Schroeder, "The internal order of the interphase nucleus", Human Genetics 25:265-297.

[VoVo 95] Donald Voet and Judith G. Voet, "Biochemistry", second edition, John Wiley & Sons Inc., 1995.

[Wa 88] W. Waldeyer, "Über Karyokinese und ihre Beziehung zu den Befruchtungsvorgängen", Archiv für mikroskopische Anatomie 32:1-122, 1888.

[WeBrE 97] Geoffrey B. West, James H. Brown, Briand J. Enquist, "A General Model for the Origin of Allometric Scaling Laws in Biology", Science 276:122-126, 1997.

[Wi 73] S. Wischnitzer, "The Submicroscopic Morphology of the Interphase Nucleus", in G. H. Bourne, J. F. Danielli, K. W. Jeon (eds.) International Review of Cytology, 34, Academic Press New York and London 1973.

[WilCa 88] T. Wilson and A. R. Carlini, "Three dimensional Imaging in Confocal Imaging Systems with Finite Sized Detectors", Journal of Microscopy 149:51-66, 1988.

[Wil 89] T. Wilson, "Three Dimensional Imaging in Confocal Systems", Journal of Microscopy 153:161-169, 1989.

[WoHo 95] C. L. Woodcock and R. A. Horowitz, "Chromatin organization re-viewed.", Trends in Cell Biology, 5:272-277, July 1995.

[Yo 95] H. Yokota, G. van den Engh, J. Hearst, R. Sachs and B. Trask, "Evidence for the organization of chromatin in megabase pair-sized loops arranged along a random walk path in the human G0/G1 interphase nucleus", Journal of Cell Biology 130:1239-1249, 1995.

[Yo 97] H. Yokota, M. J. Singer, G. J. van den Engh and B. J. Trask, "Regional differences in the compaction of chromatin in human G0/G1 interphase nuclei", Chromosome Research 3:157-166, 1997.

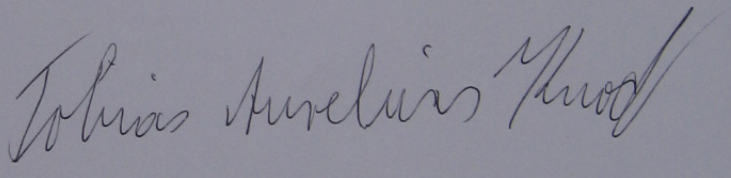
[Zi 93] R. M. Zirbel, U. Mathieu, A. Kurz, T. Cremer and P. Lichter, "Evidence for a nuclear compartment of transcription and splicing located at chromosome domain boundaries", Chromosome Research 1:92-106, 1993.

[Zo 79] C. Zorn, C. Cremer, T. Cremer and J. Zimmer "Unscheduled DNA synthesis after partial UV irradiation of the cell nucleus" Experimental Cell Research 124:111, 1979

Erklärung:

Ich versichere, daß ich diese Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Heidelberg, den 4. Februar 1998



Tobias Aurelius Knoch